Aus dem Chemischen Institut der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. Fischer

Über die Einwirkung von Alkalien auf Cystin und Cystinderivate, ein Beitrag zur Frage des labilen Schwefels in Eiweißstoffen.

*

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt am 22. April 1938 von

Theo Hornung
aus Würzburg

1938

Buchdruckerei Fritz & Rappert Nachfolger, Inhaber Anton Weltz, Ochsenfurt a. M.

Berichterstatter:
Professor Dr. G. FISCHER und Dr. A. SCHÖBERL

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet!

Vorliegende Arbeit wurde im Chemischen Institut der Universität Würzburg auf Veranlassung und unter Leitung von Herrn Dozent Dr. A. SCHÖBERL in der Zeit vom September 1935 bis Dezember 1937 ausgeführt.

An dieser Stelle möchte ich nicht versäumen, Herrn Dr. SCHÖBERL für seine tatkräftige Unterstützung und die vielen Anregungen während meiner Arbeit, sowie für das mir stets entgegengebrachte Wohlwollen meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Inhalt des theoretischen Teiles.

I. Übersicht über die hydrolytische Aufspaltung der Disulfidbindung bei Disulfidcarbonsäuren . . . . . S. 8

II. Das Problem des labilen Schwefels in Cystin und seinen Derivaten (Literaturübersicht) . . . . . S. 10

III. Der Chemismus der Spaltung von Cystinderivaten nach Bergmann und Stather . . . . . S. 12

IV. Die Hydrolyse der Disulfidbindung in Cystin . . . . . S. 15

V. Die Versuchsergebnisse . . . . . S. 16

VI. Die theoretische Wertung der Alkalispaltungen . . . . S. 20

Inhalt des experimentellen Teiles.

I. Darstellung der Präparate . . . . . S. 25
1. Isocystin . . . . . S. 25
2. l-Cystin . . . . . S. 29
3. l-Cystein . . . . . S. 30
4. Dithio-dihydracrylsäure . . . . . S. 31
5. l-Cystinhydantoin . . . . . S. 31
6. Dibenzoyl-l-cystin . . . . . S. 31
7. Diformyl-l-cystin . . . . . S. 32
8. Dibrompropionyl-l-cystin . . . . . S. 33
9. Dialanyl-l-cystin . . . . . S. 33
10. Dichloracetyl-l-cystin . . . . . S. 33
11. Diglycyl-l-cystin . . . . . S. 34
12. Dicarbobenzoxy-l-cystin . . . . . S. 35
13. Dicarbobenzoxy-l-cystinyl-diglycin . . . . . S. 36
14. l-Cystinyl-diglycin . . . . . S. 36
15. SH- und SS-Glutathion . . . . . S. 37
II. Schwefelbestimmungen . . . . . S. 38
III. Colorimetrische Bestimmungen an Disulfiden und Sulfhydryl-verbindungen . . . . . S. 39
IV. Die Spaltung der Disulfide durch Alkali . . . . . S. 47
1. Die Versuchsanordnung . . . . . S. 47
2. Die Ausführung der Spaltungen . . . . . S. 48
3. Der quantitative Verlauf der Spaltungen . . . . . S. 49

Theoretischer Teil.

Der Schwefelgehalt fast aller Eiweißstoffe bildet die Grundlage der bekannten und oft ausgeführten Schwefelbleiprobe auf Proteine. Die bei dieser Reaktion stattfindende Einwirkung von Alkalien führt bei Anwesenheit von Bleisalzen zur Abspaltung von Schwefelwasserstoff, der als Bleisulfid dann festgelegt wird. Es war verständlich, daß man sich seit langer Zeit über die der Probe zugrunde liegenden schwefelhaltigen Substanzen Gedanken machte, da man dem Chemismus der Schwefelwasserstoffabspaltung nachgehen wollte. Besonders als um die Jahrhundertwende aus Eiweißstoffen *Cystin* als Spaltprodukt isoliert wurde, konnte es keinem Zweifel mehr unterliegen, daß diese schwefelhaltige Aminosäure mit die Ursache der Schwefelbleiprobe war. Man hat deshalb auch vor allem in den Kreisen der Biochemiker die Einwirkung von Alkali auf Cystin selbst vielfach untersucht. Dem Cystin ist jedoch auch aus anderen Gründen gerade in den letzten Jahren erhöhtes Interesse entgegengebracht worden. Hierbei standen Fragen des allgemeinen Energiestoffwechsels und Fragen der Wirksamkeit von Biokatalysatoren im Vordergrund. In erster Linie ist es der Schwefelgehalt des lebensnotwendigen Cystins, durch den es vor anderen Aminosäuren ausgezeichnet ist. Vor 100 Jahren (1837) sind BAUDRIMONT und MALAGUTE zum ersten Mal auf den Schwefel im Cystinmolekül aufmerksam geworden, nachdem diese Aminosäure bereits 27 Jahre lang bekannt war. Cystin wurde als erste Aminosäure überhaupt im Jahre 1810 von WOLLASTON in Blasensteinen aufgefunden.

Für alle hier kurz berührten Fragen ist die *Art der Schwefelbindung* im Cystin von grundlegender Bedeutung. Cystin enthält eine Disulfid-(SS-)-Bindung, die, wie FRIEDMANN im Jahre 1903 schon zeigte, reduktiv zu Sulfhydryl (SH-)-Gruppen aufgespalten werden kann. Mit dieser Bindungsart ist eine gewisse Reaktionsfähigkeit verknüpft, durch die einige hochmolekulare wichtige cystinhaltige Verbindungen wie Insulin, Glutathion und die Keratine ausgezeichnet sind. Die Grundlage zum Verständnis der Wirkungs- und Reaktionsweise bildet auch hier die genaue Kenntnis der Eigenschaften der Disulfidbindung. Besonders ist es nötig, der in der Schwefelbleiprobe zum Ausdruck kommenden Instabilität gegen Alkali in Modellversuchen nachzugehen. Denn dieses Problem konnte bislang noch keineswegs als geklärt gelten. Vor allem fehlte die theoretische Deutung vieler qualitativer Befunde, die man am Cystin und seinen Derivaten im Verlaufe vieler Jahrzehnte machte.

I. Bei der Deutung chemischer Reaktionen ist es nicht vorteilhaft von kompliziert gebauten Substanzen auszugehen. In solchen Fällen können Sekundärreaktionen schwer übersehbarer Art das zugrundeliegende Reaktionsbild stören. Diese Sachlage war auch beim Cystin gegeben, dessen Aminogruppe Komplikationen voraussehen ließ. Aus diesem Grunde haben A. SCHÖBERL *und Mitarbeiter* auf breiter Basis die Untersuchung von Disulfidcarbonsäuren (I) vorgenommen[1]). In diesen Disulfiden war wohl die COOH-Gruppe, nicht aber die Aminogruppe vorhanden. Es zeigte sich, daß aus Disulfidcarbonsäuren von bestimmtem Bau mit Alkali außerordentlich rasch und leicht Schwefelwasserstoff abgespaltet werden kann. Die Beziehungen zu der Spaltbarkeit des Cystins ergaben sich so von selbst. SCHÖBERL nahm an, daß dabei eine hydrolytische Aufspaltung der Disulfidbindung im Sinne der Gleichung 1 erfolgt.

$$1.\quad RSSR + HOH = RSH + HOSR$$

Die experimentellen Ergebnisse waren mit dieser Formulierung in Einklang zu bringen. Das Gleichgewicht der Reaktion lag bei hoher Alkalikonzentration ganz auf der rechten Seite; gerade für physiologisch-chemische Fragestellungen interessant war aber die Tatsache, daß bei Disulfidcarbonsäuren auch in *neutralem,* ja sogar in saurem Medium ein Aufbrechen der Disulfidbindung erfolgen kann. Stets wurden als Reaktionsprodukte Schwefelwasserstoff und Sulfhydrylverbindung erhalten. Tabelle 1 zeigt z. B. an einer Reihe von Disulfidcarbonsäuren diese Ergebnisse.

Substrat	*% H_2S*	*% RSH*	*Literatur*
Dithio-diglykolsäure	31,6	58,8	A. SCHÖBERL, M. WIESNER A. 507, 126 (1933) Versuch Nr. 3
Dithio-dilactylsäure	35,8	49,4	A. SCHÖBERL, M. WIESNER A. 507, 127 (1933) Versuch Nr. 3
Diphenyl-dithio-diglykolsäure	53,1	54,8	A. SCHÖBERL, E. BERNINGER, Fr. HARREN B. 67, 1550 (1934)
Diphenyl-dithio-dilactylsäure	16,2	64,0	A. SCHÖBERL, H. ECK A. 522, 105 (1936)
Tetraphenyl-dithio-diglykolsäure	40,3	47,3	A. SCHÖBERL, B. 70, 1193 (1937)
Disulfid-bernstein-säure	45,5	34,0	A. SCHÖBERL, H. ECK A. 522, 115 (1936) mit Bleizusatz

Tab. 1

Die Zahlen lassen erkennen, daß die größte Menge des Schwefels als Schwefelwasserstoff und Sulfhydrylverbindung faßbar ist. Man kann sofort erkennen, daß es natürlich nie möglich ist, den *Gesamtschwefel* eines derartigen Disulfides als Schwefelwasserstoff abzuspalten, wie das beim Cystin häufig versucht wurde. Die Entstehung der Sulfhydrylverbindung hätte man auch auf eine Reduktion von unverändertem Disulfid durch Schwefelwasserstoff in alkalischer Lösung zurückführen können. Eine

[1]) Letzte Mitteilung; vergl. B. 70, 1186 (1937).

solche Möglichkeit wurde bereits durch SCHÖBERL *und Mitarbeiter*[2] diskutiert. Sie ist aber für diese Fälle aus verschiedenen Gründen abzulehnen, denn man hätte sonst elementaren Schwefel finden müssen, der entsteht, wenn man Disulfide mit z. B. Natriumsulfid reduziert. Außerdem sprechen auch Versuche mit Bleizusatz bei der Alkalispaltung dagegen. Hierbei wird der entstehende Schwefelwasserstoff sofort als Bleisulfid aus dem Reaktionssystem entfernt. Trotzdem erfolgt aber die Bildung von Sulfhydrylverbindung in dem erwarteten Umfang.

Voraussetzung für die leichte Spaltbarkeit durch Alkali war das Vorhandensein einer α-ständigen COOH-Gruppe in den untersuchten Disulfiden, welche die Disulfidbindung auflockert. Sämtliche Disulfidcarbonsäuren waren deshalb zunächst Derivate der Dithio-diglykolsäure. Die Geschwindigkeit der Aufspaltung ist eine sehr große. SCHÖBERL[3] fand an der Tetraphenyl-dithio-diglykolsäure, daß sie in längstens 30 Minuten zu Ende war.

Die Bildung der Sulfhydrylverbindung ist nach Gleichung 1 ohne weiteres zu erwarten. Die primäre Reaktion nimmt daneben noch die Entstehung der *Sulfensäure* RSOH an. Auf die Instabilität der Sulfensäure führt nun SCHÖBERL die beobachtete Schwefelwasserstoffbildung zurück. Es war in den untersuchten Systemen von vorneherein unwahrscheinlich, diese Sulfensäure etwa gar experimentell zu fassen. Sie ist zu instabil. Ihre unter Abgabe von Schwefelwasserstoff verlaufende sekundäre Spaltung ließ sich durch Isolierung von Spaltprodukten aber beweisen. Je nachdem, ob die SOH-Gruppe an ein primäres oder sekundäres C-Atom geknüpft ist, wäre dabei nach den Gleichungen 2 und 3 die Bildung einer *Aldehydsäure* bezw. von *α-Ketosäuren* zu erwarten:

2. $HOOC—CH_2SOH = HOOC—CHO + H_2S$
3. $HOOC—CH(R)SOH = HOOC—CO—R + H_2S$

Durch einen Kunstgriff ist es A. SCHÖBERL und H. ECK[4] gelungen, die in den alkalischen Lösungen instabilen Ketoverbindungen nachzuweisen. Sie führten nämlich die Spaltungen bei Gegenwart von *p-Hydrazinobenzoesäure* durch, wobei die Ketoverbindungen als stabile *Hydrazone* abgefangen wurden. Tabelle 2 enthält eine Übersicht der in guter Ausbeute isolierten Hydrazone.

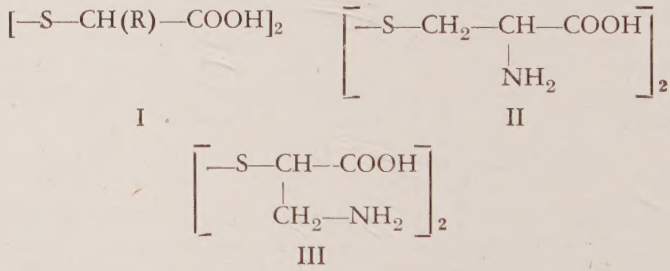
Substrat	*Entstehende Ketoverbindung*	*Hydrazonausbeute in % d. Th.*
Dithio-diglykolsäure	Glyoxylsäure	50,0
Dithio-dilactylsäure	Brenztraubensäure	67,5
Disulfid-malonsäure	Mesoxal- bezw. Glyoxylsäure	49,3
Disulfid-bernstein-säure	Oxalessig- bezw. Brenztraubensäure	32,0

Tab. 2

[2]) A. 507, 126 (1933).
[3]) B. 70, 1186 (1937).
[4]) A. 522, 105 (1936).

In der Bestimmung von Sulfhydrylverbindung, Schwefelwasserstoff und Ketoverbindungen liegen die experimentellen Beweise für die hydrolytische Aufspaltung der Disulfidbindung nach Gleichung 1. Jedoch soll schon hier darauf hingewiesen werden, daß in den Spaltansätzen auch Neben- und Folgereaktionen sich abspielen können. So wäre z. B. vor allem an eine Kondensation zwischen Sulfhydrylverbindung und Ketogruppe und an Reduktionswirkungen von Sulfiden zu denken.

II. Schon im Jahre 1933 brachte A. SCHÖBERL die an den Modellen abgeleiteten Ergebnisse in Beziehung zu dem *Problem des labilen Schwefels* in Eiweißstoffen und Cystin. Schon damals war aber auch auf die Möglichkeit des Einflusses konstitutiver Eigentümlichkeiten eindringlich hingewiesen worden. Das Experiment mußte hier die Entscheidung bringen. Ausführlicher diskutierte SCHÖBERL dann die Alkalilabilität des Schwefels im Cystin im Jahre 1934 auf der an den Disulfidcarbonsäuren gefundenen Grundlage[5]). Es sei hier jedoch mit Nachdruck betont, daß eine Ausdehnung der Versuchswertung auf Cystin nur unter gewissen Voraussetzungen zulässig ist. Denn die COOH-Gruppe ist bei den Disulfidcarbonsäuren α-ständig, beim Cystin jedoch β-ständig zur Disulfidbindung. Beim Cystin *fehlt* also die auflockernde Wirkung der COOH-Gruppe. Das ist ein wesentlicher Gesichtspunkt.



I II

III

In diesem Zusammenhang wäre die Untersuchung von Isocystin (III) von besonderem Interesse gewesen. Beim Übergang von der Disulfidcarbonsäure von der Formel I auf Cystin (II) würde diesem Isocystin (III) eine Schlüsselstellung zukommen, da es noch die α-ständige COOH-Gruppe und schon die NH_2-Gruppe des Cystins trägt. Von Isocystin ist aus diesen Gründen eine besonders große Instabilität gegen Alkalien zu erwarten. Schon S. GABRIEL[6]), der erste Bearbeiter dieser Verbindung, weist kurz darauf hin, daß aus Isocystin leichter als aus Cystin Schwefelwasserstoff abspaltbar sei. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Isocystin

[5]) Vorträge auf der 47. Jahresversammlung des V.D.Ch. in Köln am 24. Mai 1934 (Referiert in Angew. Chemie 47, 412 [1934]) und vor der Würzburger Chemischen Gesellschaft am 14. Juni 1934.

[6]) B. 38, 630 (1905).

liefert mit alkalischer Plumbitlösung *schon in der Kälte* eine intensive Bleisulfidausscheidung. Auf eine eingehendere Untersuchung der interessanten Substanz mußte jedoch verzichtet werden, da die von GABRIEL stammende umständliche Darstellungsmethode für eine Herstellung in hinreichender Menge nicht brauchbar war[7]). Der Substanz kommt vor allem auch wegen der eventuell faßbaren Abbauprodukte für die theoretische Formulierung der Disulfid-Hydrolyse bei Aminodisulfiden Bedeutung zu.

Wie schon erwähnt, ist die Schwefelabspaltung aus Cystin schon sehr häufig Gegenstand von Untersuchungen gewesen. Besonders englische und amerikanische Arbeitskreise haben sich intensiv in dieser Richtung bemüht. Da es aber hier vor allem auf den *Vergleich* mit den schon untersuchten Disulfidcarbonsäuren (I) ankam, ließen sich die bereits vorhandenen Ergebnisse, die aus völlig anderer Versuchsbedingung abgeleitet wurden, nicht direkt verwerten. Zudem gehen alle diese Arbeiten auf theoretische Vorstellungen zurück, die nicht dem dieser Arbeit zugrundeliegenden Leitgedanken entsprachen. Eine Reihe von Arbeiten brauchen deshalb überhaupt nicht berücksichtigt zu werden, weil die Versuchsbedingungen auf die Eigenart der bei den Reaktionen entstehenden Produkte zu wenig Rücksicht nahmen. So müssen z. B. alle Arbeiten ausscheiden, die nicht unter völligem Ausschluß von Sauerstoff durchgeführt wurden. Auch die unter *Bleizusatz* angestellten Versuche lassen sich direkt nicht verwerten, da Bleiionen den vermutlich in einem chemischen Gleichgewicht festgelegten Schwefelwasserstoff als Bleisulfid entfernen und so wahrscheinlich eine Störung des Gleichgewichtsverhältnisses hervorrufen. Sehr häufig hat man Cystin einzig und allein deshalb der Alkalieinwirkung unterworfen, um *möglichst viel Schwefel* abzuspalten. In der Literatur finden sich hierfür Werte zwischen rund 50 und 80% angegeben. Allen diesen Arbeiten lag eine an sich falsche Fragestellung zugrunde. In den letzten Jahren ist besonders ausführlich von J. C. ANDREWS[8]), R. A. GORTNER *und Mitarbeitern*[9]) und H. T. CLARKE *und Mitarbeitern*[10]) über das Verhalten von Cystin und Cystinderivaten gearbeitet worden. Als Spaltprodukte sind in erster Linie neben *Schwefelwasserstoff, Ammoniak und Brenztraubensäure* beschrieben worden. Die Ammoniakbildung hängt ursächlich mit der Schwefelwasserstoffabspaltung zusammen. Sie bedingt mit die komplizierte Natur der Alkalieinwirkung, wenn man mit der Spaltung der Disulfidcarbonsäuren (I) vergleicht. Die Annahme der Entstehung von Brenztraubensäure geht schon auf Ergebnisse zurück, die HOPPE-SEYLER[11]) und E. BAUMGARTEN[12]) um die 80er Jahre des vorigen Jahrhunderts erhielten. Brenztraubensäure wird in alkalischer Lösung leicht verändert.

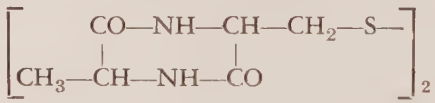
---

[7]) vergl. den experimentellen Teil.
[8]) Journ. biol. Chem. 80, 191 (1928); 87, 681 (1930).
[9]) Journ. biol. Chem. 99, 383 (1933).
[10]) Journ. biol. Chem. 89, 399 (1930); 84, 541 (1931); 106, 667 (1934).
[11]) Ztschr. physiol. Chem. 5, 330 (1881).
[12]) B. 15, 734 (1882).

Um ihre Isolierung haben sich vor allem H. T. CLARKE und J. M. INOUYE[13]) Verdienste erworben. In fast allen Arbeiten wird aber der Entstehung von Sulfhydrylverbindungen keinerlei Bedeutung beigemessen. Zumeist wurde bei der Spaltung von Cystin und seiner Derivate die *Möglichkeit* der Bildung solcher Sulfhydrylkörper garnicht erwähnt. Das ist wohl der schwerwiegendste Einwand, den man gegen die Arbeiten auf diesem Gebiet anführen kann. Es wird damit ein wesentlicher Gesichtspunkt bei dem Chemismus der Reaktion außer Acht gelassen. Nur J. C. ANDREWS[14]) hat die Cysteinbildung bei der Cystinspaltung ausführlicher diskutiert.

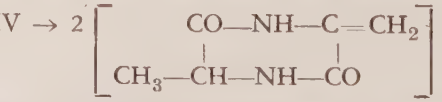
Es ist noch wichtig, hier auf eine Gesetzmäßigkeit hinsichtlich der Leichtigkeit der Schwefelwasserstoffabspaltung hinzuweisen. Die Reihe *zunehmender Instabilität* verläuft vom Cystin über Cystinpeptide und Eiweißstoffe zu Cystinderivaten, in denen das Cystin in gewissen *Ringen* festgelegt ist (Hydantoine, Diketopiperazine). Dabei sind die Unterschiede im Reaktionsvermögen sehr groß[15]). Cystin selbst ist verhältnismäßig stabil; andererseits gibt es aber äußerst labile Cystinderivate. In dieser Richtung ist noch eine erhebliche Erweiterung des experimentellen Materials anzustreben.

III. Für die theoretische Deutung all dieser Ergebnisse ist in den letzten Jahren fast ausschließlich eine Vorstellung herangezogen worden, die M. BERGMANN und F. STATHER[16]) im Jahre 1926 an dem Verhalten von *Dialanyl-cystin-anhydrid* (IV) entwickelten. Dieses Diketopiperazin



IV

wird von Alkali äußerst leicht schon in der Kälte unter Bildung von Schwefel und Schwefelwasserstoff gespalten. Als schwefelfreies Umwandlungsprodukt entsteht dabei eine hochmolekulare Form von 3-Methylen-6-methyl-2,5-dioxopiperazin. BERGMANN und STATHER formulierten die Spaltung des Disulfides nach Gleichung 4 in folgender Weise:



Das primär entstehende Methylen-diketopiperazin polymerisiert sich dann zu $(C_6H_8O_2N_2)_x$. BERGMANN und STATHER untersuchten dann auch unter

[13]) Journ. biol. Chem. 89, 399 (1930).
[14]) Journ. biol. Chem. 80, 191 (1928).
[15]) vergl. CH. R. HARINGTON, TH. H. MEAD, Biochem. Journ. 30, 1598 (1936).
[16]) Ztschr. physiol. Chem. 152, 189 (1926).

den gleichen Bedingungen das nahe verwandte *Dialanylcystin* (X), aus dem ja das untersuchte Diketopiperazin durch Wasserabspaltung entsteht. Dieses Dipeptid erwies sich als viel stabiler, ja es spaltete sogar unter den Bedingungen der Diketopiperazinspaltung überhaupt keinen Schwefel ab. Die Eingliederung des Cystins in den Diketopiperazinring brachte also eine auffällige Lockerung der SS-Bindung. Durch die Ringbildung müssen die Affinitätsverhältnisse sehr stark geändert werden. Eine Deutung erscheint zunächst schwierig, besonders, wenn man bedenkt, daß zwischen SS-Brücke und dem Ring noch die Methylengruppe eingeschoben ist. Nach der Ansicht von BERGMANN und STATHER handelt es sich daher nicht etwa nur um die Sprengung der SS-Brücke oder einen Austausch des Schwefels gegen OH oder dergleichen durch Hydrolyse, sondern um eine Heraussprengung des Schwefels zusammen mit Wasserstoff. Vielleicht spielen tautomere Formen des Diketopiperazins in der alkalischen Lösung eine Rolle, eine Möglichkeit, die BERGMANN und STATHER nicht diskutierten.

Den am Dialanyl-cystin-anhydrid abgeleiteten Spaltungsmechanismus übertrugen BERGMANN und STATHER nun auch auf Cystin, *ohne selbst Versuche an Cystin oder weiteren Derivaten anzustellen.* Cystin soll nach dieser Vorstellung mit Alkali zunächst unter Abspaltung von Schwefelwasserstoff und Schwefel in *α-Amino-acrylsäure* übergehen. (Gleichung 5):

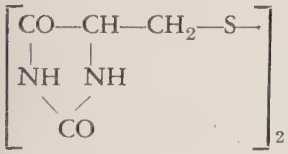
5. $HOOC—CH(NH_2)—CH_2—SS—CH_2—CH(NH_2)—COOH \rightarrow 2\ CH_2{=}C(NH_2)—COOH + H_2S + S$

Die unbeständige α-Aminoacrylsäure sollte dann über die Iminobrenztraubensäure durch Hydrolyse in Brenztraubensäure und Ammoniak gespalten werden (Gleichung 6):

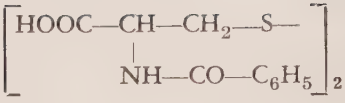
6. $CH_2{=}C(NH_2)—COOH \rightarrow CH_3—C(=NH)—COOH \xrightarrow{HOH} CH_3—CO—COOH + NH_3$

BERGMANN und STATHER haben ihre Ansicht über die Alkalispaltung von Cystin und seinen Derivaten und weiterhin von cystinhaltigen Proteinen an einer *einzigen Modellreaktion* entwickelt. Gegen diesen Modellversuch ist vor allem einzuwenden, daß die Spaltungsart wohl im Prinzip klargestellt, daß aber keine quantitative Aufarbeitung vorgenommen wurde. Besonders fehlt eine exakte Bestimmung von Schwefelwasserstoff und Schwefel.

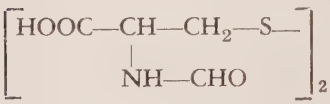
$[HOOC—CH_2—CH_2—S—]_2$ Dithio-dihydracrylsäure (V)



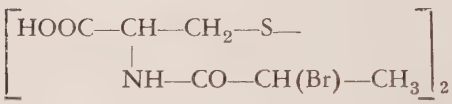
Cystinhydantoin (VI)



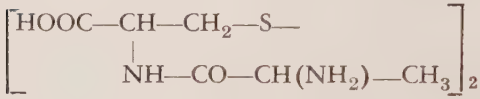
Dibenzoyl-cystin (VII)



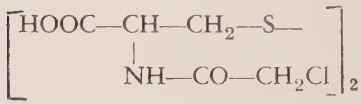
Diformyl-cystin (VIII)



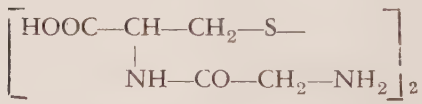
Dibrompropionyl-cystin (IX)



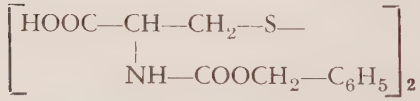
Dialanyl-cystin (X)



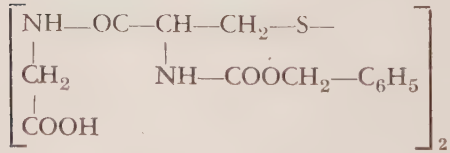
Dichloracetyl-cystin (XI)



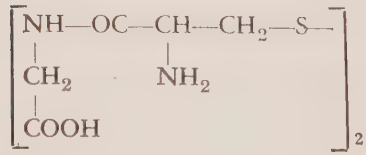
Diglycyl-cystin (XII)



Dicarbobenzoxy-cystin (XIII)



Dicarbobenzoxy-cystinyl-diglycin (XIV)



Cystinyl-diglycin (XV)

IV. Diese Ansichten wurden in der Folgezeit von fast allen Autoren zur Deutung der Versuchsergebnisse herangezogen[17]). M. BERGMANN hat später noch zweimal Gelegenheit genommen, auf die allgemeine Gültigkeit seiner Anschauungen hinzuweisen[18]). Demgegenüber hat A. SCHÖBERL auf Grund der eingehenden Untersuchung der Disulfidcarbonsäuren (I) auch für Cystin und seine Derivate die Gültigkeit von Gleichung 1 gefordert. Nach ihm besteht auch hier die Wirkung der Alkalien auf einer hydrolytischen Öffnung der SS-Bindung als der Primärreaktion im Sinne der Gleichung 7:

7. $[HOOC—CH(NH_2)—CH_2—S—]_2 + HOH \rightarrow$
$HOOC—CH(NH_2)—CH_2—SH + HOOC—CH(NH_2)—CH_2—SOH$

Hiernach werden Cystein und eine Sulfensäure gebildet. Die Schwefelwasserstoffabspaltung müßte dann wie bei den anderen Beispielen auf die instabile Sulfensäure zurückgeführt werden, die dabei eine Amino-aldehydsäure liefert (Gleichung 8):

8. $HOOC—CH(NH_2)—CH_2—SOH \rightarrow$
$HOOC—CH(NH_2)—CHO + H_2S$

Daß eine Verbindung wie diese Amino-aldehydsäure nun in alkalischer Lösung sehr unbeständig ist, erscheint auf Grund des Verhaltens ähnlich gebauter Substanzen ohne weiteres verständlich. Ihre unter Ammoniakabspaltung verlaufende Umwandlung durch Alkali muß letzten Endes zu Brenztraubensäure führen. Es ist anzunehmen, daß der erste Schritt dabei eine hyrolytische Abspaltung der NH_2—Gruppe unter Bildung einer *Oxyaldehydsäure* ist (Gleichung 9):

9. $HOOC—CH(NH_2)—CHO \xrightarrow{HOH} HOOC—CH(OH)—CHO + NH_3$

Für die Umformung dieser Oxy-aldehydsäure könnten, besonders wenn man die Komponenten des Reaktionsmilieus berücksichtigt, eine Reihe von Deutungsmöglichkeiten herangezogen werden. Doch können hier nur Versuche an geeigneten Systemen entscheiden.

Während der Durchführung der vorliegenden Arbeit erschienen mehrere Untersuchungen anderer Arbeitskreise, bei denen die Vorstellung von SCHÖBERL auf das Reaktionsvermögen verschiedener cystinhaltiger Verbindungen übernommen wurden. So haben K. FREUDENBERG und TH. WEGMANN[19]) die *Alkaliinaktivierung von Insulin* auf die hydrolytische Aufspaltung der SS-Bindungen nach Gleichung 10 zurückgeführt:

10. $2\ Ins.SSR + 2\ H_2O \rightarrow Ins.SH + HOSR$ und $Ins.SOH + HSR$

---

[17]) Von den von B. H. NICOLET, Amer. Soc. 53, 3066 (1931) an Thioäthern entwickelten Anschauungen soll hier abgesehen werden. Man muß stets streng zwischen Sulfhydrylverbindung und Disulfid unterscheiden.

[18]) Klin. Woch. 11, 1569 (1932); Naturwiss. 22, 135 (1934).

[19]) Ztschr. physiol. Chem. 233, 159 (1935); K. FREUDENBERG, Forschungen und Fortschritte Bd. 11, 55 (1935).

Die beobachtete H_2S-Abspaltung würde auch hierbei der Instabilität der SOH-Verbindungen zu verdanken sein. Auch das Oxytocin[20], ein Hormon des Hypophysenhinterlappens enthält eine für die Wirksamkeit notwendige SS-Gruppe. Die vorliegende Hydrolyse diente weiterhin bei *cystinhaltigen Eiweißstoffen*, z. B. den Keratinen und bei den ebenfalls hierher gehörenden *Fermenten* (Papain, Kathepsin) mehrfach zur Deutung gewisser Reaktionen und zu neuen Fragestellungen[21]. Vor allem sind die Vorstellungen von SCHÖBERL zur Deutung der Änderung der Fasereigenschaft bei der Behandlung von *Schafwolle* mit Alkali oder Wasser herangezogen worden. Schon vor dem Bekanntwerden dieser Arbeiten aus den Kreisen englischer und amerikanischer Wollchemiker sind von SCHÖBERL gemeinsam mit J. SEXTL Versuche an Wolle in der gleichen Richtung begonnen worden[22]. I. A. CROWDER und MILTON HARRIS[23] wiesen sogar nach Alkalieinwirkung auf die Wollfaser die der Theorie nach zu fordernden CO- und SH-Gruppen nach. Ferner diskutierten J. B. SPEAKMAN, J. L. STOVES[24] und P. R. MC MAHON und J. B. SPEAKMAN[25] das Schicksal von SOH-Gruppen auf der Wollfaser. Interessant ist, daß H. PHILLIPS[26] auch auf die Möglichkeit der Bildung neuer Querverbindungen aus CO- und benachbarten NH_2-Gruppen zwischen den langen Peptidketten hinwies.

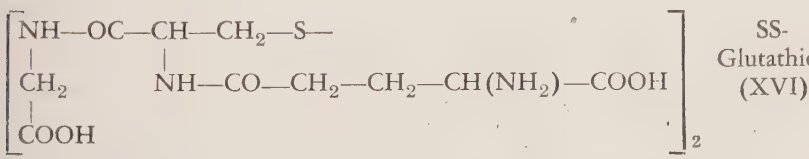
V. Bei dieser Sachlage war es eine dringende Frage zu überprüfen, ob die einfache unveränderte Übertragung der an den Disulfidcarbonsäuren (I) abgeleiteten Gesetzmäßigkeiten auf Cystinderivate zulässig war. Es war dies, wie schon erwähnt, besonders deshalb nötig, weil bei diesen Disulfiden die SS-Gruppe nicht durch eine benachbarte COOH-Gruppe aufgelockert wird. Zugleich sollte der Gültigkeitsbereich der Vorstellungen von BERGMANN und STATHER abgegrenzt werden. Es war zu hoffen, aus der Deutung der Reaktionsfähigkeit der SS-Gruppe neue Gesichtspunkte für biologisch nicht uninteressante Stoffklassen zu gewinnen. Das aber war das Ziel der vorliegenden Arbeit.

Jede Deutung der Alkalieinwirkung auf Cystein hat in erster Linie zwei grundlegende Gesichtspunkte zu berücksichtigen, nämlich die im Vergleich zu Cystin *außerordentlich große Stabilität von Cystein und von Dithio-dihydracrylsäure* $(HOOC—CH_2—CH_2—S)_2$. Von letzterer Verbindung leitet sich ja Cystin durch Einführung der NH_2-Gruppe ab. Wohl scheint man nach Angabe der Literatur[27] auch aus Cystein durch Alkali H_2S herausspalten zu können, man darf aber keineswegs Cystin und Cystein

[20]) K. FREUDENBERG, E. WEISS, H. BILLER, Ztschr. physiol. Chem. 233, 172 (1935).
[21]) vergl. TH. BERSIN, Kurzes Lehrbuch der Enzymologie. Leipzig (1938).
[22]) Collegium VII, 412 (1936).
[23]) Am. Dyest. Rep. 25, 264 (1936).
[24]) Soc. of Dyers and Colourists 1937, 236.
[25]) Trans. of Farad. Soc. Vol. 33, 844 (1937).
[26]) Nature 138, 121 (1936).
[27]) H. T. CLARKE, J. M. INOUYE, Journ. biol. Chem. 89, 399 (1930).

in dieser Beziehung schematisch gleich behandeln. Dies ist jedoch öfters in der Literatur geschehen. Der Versuch ergab (Spaltung Nr. 2, IIa) eindeutig, daß Cystein nicht im geringsten unter Bedingungen angegriffen wird, bei denen ein weitgehender Abbau am Cystin erfolgt. Dies stimmt durchaus mit gelegentlichen Angaben über die größere Beständigkeit von Cystein gegen Alkali überein[28]. Bei der Dithiodihydracrylsäure (Spaltung Nr. 3, V) liegt das Gleichgewicht der Hydrolyse nach Gleichung 1 weitgehend auf der linken Seite; es wurden nur 6,1% H_2S und 8,8% Thiohydracrylsäure gefunden. Eine zur SS-Bindung β-ständige COOH-Gruppe vermag also keine Auflockerung zu bewirken. Daß im Prinzip auch bei diesem stabilen Disulfid die Hydrolyse jedoch eintritt, zeigen die ermittelten Zahlen.

Neben Cystin wurden in der vorliegenden Arbeit eine Reihe von Derivaten dieser Aminosäure untersucht. Eine Zusammenfassung der Verbindungen findet sich auf S. 13. u 14. Bei der Auswahl der Derivate spielte die schrittweise Angleichung an strukturelle Beziehungen in cystinhaltigen Naturstoffen eine Rolle. Besonders schien die Festlegung der Aminogruppen durch *Acylierung* wesentlich; es wurde dazu der *Benzoyl-, Formyl-, Brompropionyl-, Chloracetyl- und Carbobenzoxy-Rest* benutzt. Ferner spaltete man *Peptide*, nämlich *Dialanyl- und Diglycyl-cystin und Cystinyl-diglycin*. Die beiden letzten Präparate ermöglichten Aussagen über den Einfluß der Reihenfolge der Komponenten in Peptiden. Aufschlußreich war die Untersuchung eines *acylierten Dipeptides*, des *Dicarbobenzoxy-cystinyl-diglycin*. Schließlich dehnte man die Versuche auch noch auf *SH- und SS-Glutathion* aus. *Im Cystinhydantoin* war ferner der Cystinrest in einem Ring festgelegt.



SS-Glutathion (XVI)

Von den Versuchsbedingungen sei hier erwähnt, daß die Spaltungen mit 0,02 mol. Substratlösungen mit zumeist 12 Molen NaOH pro Mol Disulfid bei 99° durchgeführt wurden. Die Zersetzungszeit betrug fast immer 2 Stunden. Die ausgewählte Alkalikonzentration ist, verglichen mit Angaben der Literatur, als sehr gering zu bezeichnen. In jedem Spaltansatz waren zur Prüfung der theoretischen Vorstellungen eine Reihe von Bestimmungen notwendig. Neben der Ermittlung des abgespaltenen H_2S und des NH_3 wurde vor allem ganz besonderer Wert auf die *Bestimmung der SH-Verbindung* gelegt. Es geschah dies absichtlich auf zweifache

[28]) C. I. B. Thor, R. A. Gortner, Journ. biol. Chem. 99, 383 (1933); J. C. Andrews, Journ. biol. Chem. 87, 681 (1930); H. T. Clarke, J. M. Inouye, Journ. biol. Chem. 89, 399 (1930).

Weise, durch jodometrische Titration und durch Colorimetrieren mit 9(18)-Wolframsäure-Phosphorsäure nach einer im hiesigen Institut entwickelten Methode. Stets wurde auch auf das Auftreten von *elementarem Schwefel* geachtet. Schließlich spielte selbstverständlich auch noch die Erfassung von *unverändertem Ausgangsmaterial* eine Rolle. Auch dies geschah durch colorimetrische Bestimmung mit Phosphorwolframsäure nach Einwirkung von Sulfit auf die Disulfide. Tabelle 10 zeigt, daß die meisten der gespaltenen Cystinderivate hierbei etwa die gleichen Reduktionsäquivalente besitzen und sich daher mit Natriumsulfit glatt nach Gleichung 11 umsetzen:

$$11. \quad RSSR + Na_2SO_3 \rightarrow RSNa + RS{-}SO_3Na \quad ^{29})$$

Etwas langsamer reagieren nur Dibrompropionyl-, Dialanyl- und Dichloracetyl-cystin. Bei dieser Bestimmung von Cystinderivaten ist es sehr wesentlich, daß das Sulfit in hinreichender Konzentrarion und genügend lange einwirken kann. Diese Einflüsse waren am Diformyl-cystin sehr drastisch festzulegen[30]). Die durch die NH_3- und Kjeldahl-Bestimmungen ermittelte Stickstoffbilanz wurde durch van Slyke-Bestimmungen ergänzt. Letzteres war besonders auch deshalb nötig, weil bei der Einwirkung von Alkali auf Cystinderivate ja auch NH_2-Gruppen freigelegt werden. Eine Übersicht über die wichtigsten miteinander vergleichbaren Ergebnisse enthält die Tabelle 3. Beim Vergleich der Zahlen ist zu beachten, daß die NH_3-Werte nur auf den Cystinstickstoff in den Derivaten bezogen wurden.

Die Spaltung von Cystin (Spaltungen Nr. 1, II) mit Natronlauge lieferte *sehr viel* Cystein[31]) und recht wenig H_2S und NH_3. Nach der Spaltung schienen immerhin noch rund 24% unverändertes Cystin vorhanden zu sein. Bemerkenswert ist, daß *kein* elementarer Schwefel gebildet wird. Erhöhung der Zersetzungszeit und Alkalikonzentration geht ziemlich eindeutig mit einer Erhöhung von H_2S-, NH_3- und Cystein-Ausbeute einher. Bei den übrigen untersuchten Disulfiden waren die abgespaltenen H_2S- und NH_3-Mengen zumeist um ganz erhebliche Beträge höher. Außerdem handelte es sich meistens um etwa äquivalente Mengen an beiden Stoffen; auf die Ausnahmen wird später eingegangen werden. (So ergaben z. B. Cystinhydantoin nur 8,4% und Dicarbobenzoxy-cystinyl-diglycin 4,1% Cystin-NH_3.) Viel NH_3 wurde vor allem aus Diformyl-cystin (50,6%), Cystinyl-diglycin (41,8%) und SS-Glutathion (57,6%) abgespalten. Diese Beträge übersteigen den Cystinwert von 16,2% ganz beträchtlich. Besonders hohe H_2S-Mengen wurden aus Cystinhydantoin (52,2%), Diglycyl-cystin (28,8%), Dicarbobenzoxy-cystinyl-diglycin (50,8%), Cystinyl-diglycin (32,6%) und SS-Glutathion (68,8%) gebildet.

Ein etwas anderes Bild gibt der Vergleich der entstandenen SH-Ver-

---

[29]) vergl. auch die Wertung dieses Versuchsmaterials durch A. SCHÖBERL und P. RAMBACHER, Biochem. Ztschr. im Druck.

[30]) vergl. A. SCHÖBERL, E. LUDWIG, B. 70, 1422 (1937).

[31]) Inzwischen *isolierte* P. HOLTZ, Klin. Woch. 12, 1876 (1933) Cystein aus solchen Spaltansätzen.

Spaltungs-Nr.	Präparat		Cystin-NH_3 % d. Th.	NH_2-N % d. Th.	Gesamt-N % d. Th.	Elem.-S % d. Th.	H_2S % d. Th.	SH (jod.) % d. Th.	SH (col.) % d. Th.	SS (col.) % d. Th.	Rest-S % d. Th.
1	Cystin	II	16,2	74,9	—	0	8,3	46,5	41,7	23,8	72,0
2	Cystein	IIa	0	100,0	104,4	0	1,7	97,5	98,5	—	—
3	Dithio-dihydracryl-säure	V	—	—	—	0	6,1	8,8	—	—	—
4	Cystinhydantoin	VI	8,4	—	—	51,5	52,2	0	0	0	0
5	Dibenzoyl-cystin	VII	20,6	35,2	76,1	0	22,4	8,0	8,9	18,8	—
6	Diformyl-cystin	VIII	50,6	50,8	—	20,8	20,2	32,8	26,5	16,7	36,8
7	Dibrompropionyl-cystin	IX	21,2	71,5	—	0	18,8	26,6	12,4	7,3	—
8	Dialanyl-cystin	X	25,3	53,1	86,8	3,1	23,6	39,0	18,0	19,4	—
9	Dichloracetyl-cystin	XI	29,4	64,1	75,8	0	25,9	31,0	17,4	0	—
10	Diglycyl-cystin	XII	30,6	63,7	83,9	0	28,8	29,2	24,5	14,2	—
11	Dicarbobenzoxy-cystin	XIII	15,9	48,8	85,0	0	13,3	24,9	25,6	4,3	—
12	Dicarbobenzoxy-cystinyl-diglycin	XIV	4,1	17,2	95,0	25,2	50,8	0	0	15,4	—
13	Cystinyl-diglycin	XV	41,8	66,2	77,8	0	32,6	34,0	36,9	11,5	—
14	SS-Glutathion	XVI	57,6	58,8	81,8	14,6	68,8	0	0	6,3	—
15	SH-Glutathion	XVII	17,6	72,3	95,5	0	43,0	60,1	64,0	—	—

Tabelle 3

bindungen. Ihre jodometrischen und colorimetrischen Bestimmungen lieferten nur in drei Fällen (VII, XIII, XV) hinreichend gut übereinstimmende Zahlen. Sonst kommen aber große Unterschiede vor; mitunter sind die jodometrisch ermittelten Werte doppelt so hoch (IX, X, XI). Die Tendenz zu zu hohen Werten ist nur so zu erklären, daß bei der jodometrischen Titration neben den SH-Verbindungen noch andere Stoffe mitbestimmt werden. Diese Gefahr ist bei der colorimetrischen Bestimmung sicher nicht vorhanden. Die Phosphorwolframsäure als *schwaches* Oxydationsmittel dürfte nur auf die SH-Verbindungen ansprechen. Hierin liegt auch der Wert dieser Bestimmungsmethode. Über die Art der von Jod angreifbaren Körper lassen sich nur Vermutungen äußern. Diese Verhältnisse sind von Interesse als Hinweis auf die *Kompliziertheit* der sich abspielenden Reaktionen. Was nun die Menge der gebildeten SH-Verbindungen anlangt, so bleibt diese weit hinter dem Cysteinwert von 41,7% zurück. Nur Cystinyl-diglycin mit 36,9% kommt diesem am nächsten. Dibenzoyl-cystin mit 8,9% SH-Verbindung ergab den kleinsten Wert, allerdings mit ziemlichem Abstand von fast allen Disulfiden. Völlig aus der Reihe fallen Cystinhydantoin, Dicarbobenzoxy-cystinyl-diglycin und SS-Glutathion, die überhaupt keine SH-Verbindung liefern. Diese Vertreter ergaben andererseits eine beträchtliche Abspaltung von *elementarem Schwefel*. Das Gleiche war der Fall beim Diformyl-cystin und Dialanyl-cystin. Die Menge an *unverändertem Disulfid* nach den Spaltungen war in allen Fällen *kleiner* als beim Cystin. Bei diesen Bestimmungen muß man natürlich annehmen, daß Sulfit wirklich nur mit noch vorhandenen SS-Gruppen reagiert.

Beim Diformyl-cystin ist eine *präparative Aufarbeitung* des Spaltungsansatzes vorgenommen worden. Es wurden hierbei *Cystein* und *Brenztraubensäure* als p-Carboxy-phenylhydrazon abgetrennt.

Es sei noch betont, daß sich an den van Slyke-Bestimmungen einige Befunde hinsichtlich der Leichtigkeit der Hydrolyse der CO-NH-Bindung ableiten lassen. Die reinen Acylreste wie Formyl-, Brompropionyl-, Chloracetyl-, Carbobenzoxy- und Benzoyl-Rest werden unter den gewählten, wirklich nicht als energisch zu bezeichnenden Bedingungen weitgehend hydrolytisch abgespalten. Demgegenüber tritt bei den entsprechenden Peptiden Dialanyl- und Diglycyl-cystin die Hydrolyse wesentlich langsamer ein[32]). Naturgemäß muß die Freilegung der NH_2-Gruppen des Cystins *ursächlich* mit der *NH_3-Abspaltung* verknüpft sein. Dies zeigt auch deutlich das untersuchte acylierte Dipeptid Dicarbobenzoxy-cystinyl-diglycin an. Der geringen Hydrolyse (17,2% NH_3-N) entspricht hier nur eine kleine NH_3-Abspaltung (4,1%). Es wird bei diesem Beispiel wohl in erster Linie die NH_2-Gruppe des Glycins freigelegt.

VI. Die theoretische Wertung des gesamten Versuchsmaterials für den Chemismus der Reaktionen stößt wegen des nicht sehr einheitlichen

[32]) Bei der Wertung der Zahlen für den NH_2-N ist zu bedenken, daß in diesen Peptiden 50% des Gesamt-N schon als NH_2-N vorliegen.

Bildes auf Schwierigkeiten. Zunächst seien nur die Beispiele herangezogen, bei denen die SH-Verbindungen gefaßt werden konnten. Mit ziemlicher Sicherheit scheint aus den Versuchen hervorzugehen, daß das Schema von BERGMANN auf jene Fälle nicht angewandt werden darf. Denn diese Ansicht diskutiert die Entstehung von SH-Körpern überhaupt nicht. Letzteres wurde hier aber einwandfrei, *an den Cystinderivaten zum ersten Mal,* erwiesen. Nach BERGMANN wäre auch stets die Bildung von elementarem Schwefel zu fordern. Auch dies ist allgemein *keineswegs* der Fall. Von der geringen Schwefelabspaltung aus Dialanyl-cystin kann als nicht wesentlich abgesehen werden und die verhältnismäßig hohe Menge an elementarem Schwefel beim Diformyl-cystin wird wohl auf Komplikationen durch die quantitativ abgespaltene Ameisensäure zurückzuführen sein. Man darf also durchaus auch für Cystin und seine Derivate die hydrolytische Aufspaltung der SS-Bindung nach Gleichung 1 als Primärreaktion bei der Alkalispaltung in Betracht ziehen.

Das Bild der Hydrolyse tritt aber aus verschiedenen Gründen nicht so klar zu Tage, wie bei den von SCHÖBERL *und Mitarbeitern* untersuchten α-Disulfidcarbonsäuren. Alle Anzeichen sprechen dafür, daß bei diesen die Hydrolyse weitgehend bis zu Ende verläuft, während hier sich ein *Gleichgewicht* einstellt. Dafür spricht in erster Linie, daß sich in den Spaltansätzen noch unzersetztes Disulfid nachweisen ließ. *Cystin und seine Derivate sind also im allgemeinen gegen Alkali stabiler als die α-Disulfidcarbonsäuren.* Es entspricht dies durchaus der Ableitung dieser Substanzen von der Dithio-dihydracrylsäure. Die COOH-Gruppe vermag hier die SS-Bindung nicht wesentlich aufzulockern, jedoch wirkt dem die NH_2-Gruppe wiederum entgegen. Eine Diskussion über die *Lage des Gleichgewichtes* wird durch die Eigenschaften der entstehenden Reaktionsprodukte erschwert. Systeme, die SH-, CO-Gruppen und H_2S enthalten, können zu mancherlei Komplikationen Anlaß geben. Eigentlich müßten SH- und H_2S-Werte einander entsprechen; das ist aber mitunter in keiner Weise der Fall. Zu geringe SH-Werte lassen sich durch Annahme von Kondensation zwischen SH- und CO-Verbindungen erklären. Zu hohe SH-Werte, wie vor allem beim Cystin, scheinen auf eine gewisse Stabilität der Sulfensäuren oder auf eine andere Umwandlungsart dieser Sulfensäuren hinzuweisen. Nach SCHÖBERL könnte man z. B. an eine Disproportionierung nach Gleichung 12 zu Sulfhydrylverbindung und Sulfinsäure denken:

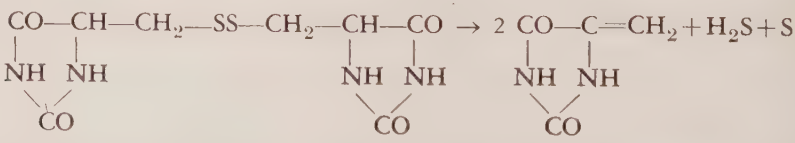
$$12. \qquad 2\ RSOH \rightarrow RSH + RSO_2H$$

Hiernach wäre zwischen primär und sekundär entstehender SH-Verbindung zu unterscheiden, was ebenfalls zu hohe SH-Werte deuten könnte.

Wenn man nach der Stabilität der untersuchten Substanzen Alkali gegenüber fragt und dabei die Abspaltung von H_2S und NH_3 im Auge hat, kommt man zu folgenden Feststellungen. Cystin erweist sich als recht stabil. Ihm am nächsten kommt Dicarbobenzoxy-cystin. Im allgemeinen bringt aber eine *Substitution an der NH_2-Gruppe durch den RCO-Rest eine Erhöhung der Alkaliempfindlichkeit.* Die Natur des RCO-Restes ist jedoch

von großer Bedeutung. Besonders der Formylrest bedingt eine große Labilität; ihm scheint eine Sonderstellung zuzukommen. *Cystinpeptide* können weitgehend gespalten werden. Ziemlich übersichtliche Verhältnisse brachte die Untersuchung von *Diglycyl-cystin und Cystinyl-diglycin.* Hier tritt die Hydrolyse der SS-Bindung verhältnismäßig ungestört zu Tage. Außerdem erkennt man deutlich hieraus den großen Einfluß der *Anordnung der Bausteine* in Dipeptiden. Denn Cystinyl-diglycin wird von Alkali stärker als Diglycyl-cystin gespalten. Dieses scheint deshalb auffällig, weil im Cystinyl-diglycin die NH_2-Gruppe des Cystins frei ist. Bei diesem Beispiel führt mithin die Festlegung der Cystin-COOH-Gruppe in einer Peptidbindung zu der hohen Instabilität. Cystinpeptide scheinen also wohl stets *unabhängig von der Art des Cystineinbaues* gegen Alkali wesentlich instabiler als Cystin selbst zu sein. Weiterhin wird vermutlich der quantitative Verlauf solcher Spaltungen Schlüsse auf die *Anordnung der Bausteine* in solchen Peptiden zulassen.

Eine besondere Besprechung verlangt Cystinhydantoin (VI). Dieses Disulfid gibt bei der alkalischen Spaltung rund 50% H_2S und 50% elementaren Schwefel und dementsprechend *keine Spur einer SH-Verbindung.* Die äußerst leichte Zersetzlichkeit ist auch von W. C. Hess[33]) und J. C. Andrews und K. C. Andrews[34]) schon kurz erwähnt worden. Eine quantitative Untersuchung ist bisher weder an ihm noch an irgendeinem Derivat durchgeführt worden. Der Substanz kommt vor allem wegen der Beziehung zu dem von Bergmann und Stather untersuchten Diketopiperazin Bedeutung zu. In dem Hydantoin ist das Cystinmolekül ebenfalls *in einem Ring* festgelegt. Dies dürfte der Grund sein, warum auch bei ihm die Annahme einer hydrolytischen Aufspaltung der SS-Bindung bei der Deutung der Ergebnisse *nicht* zum Ziele führt. Schon durch den glatten und eigenartigen Verlauf der Spaltung, bei der übrigens ebenfalls Brenztraubensäure-p-carboxy-phenylhydrazon nachgewiesen wurde, ist Cystinhydantoin scharf von sämtlichen anderen Disulfiden zu unterscheiden. Die experimentellen Ergebnisse machen es also durchaus verständlich, wenn man die Zersetzung beider Stoffklassen nicht nach dem gleichen Chemismus formuliert. Im Sinne der Bergmann'schen *Ansicht* ist also anzunehmen, daß Cystinhydantoin nach Gleichung 13 in *5-Methylen-hydantoin,* H_2S und S zerfällt:

13. 

Das Methylenhydantoin kann sich dann unter Abspaltung von Harnstoff in Brenztraubensäure umwandeln. Harnstoff unterliegt natürlich in

[33]) Am. Soc. 56, 1421 (1934).
[34]) Journ. biol. Chem. 105, IV (1934).

dem alkalischen Milieu einer weiteren Umwandlung, die bekanntlich über Ammoniumcyanat führt. Die beobachtete sehr geringe NH_3-Bildung steht mit den Ergebnissen der von CH. E. FAWITT[35]) untersuchten Kinetik der Spaltung von Harnstoff durch Alkali in Einklang. Im Vergleich mit den anderen Disulfiden war es von Anfang an auffällig, daß aus Cystinhydantoin so wenig NH_3 abgespalten werden konnte. Wie bei den Diketopiperazinen Bergmanns bleibt auch hier die leichte Sprengung der C-S-Bindung merkwürdig. Auf jedem Fall muß durch die Ringbildung eine sehr starke *Verschiebung der Bindungsverhältnisse* erfolgt sein. Dabei dürften wohl tautomere Umlagerungen in der alkalischen Lösung eine Rolle spielen. Die Hydrolyse der SS-Bindung als Primärvorgang würde sehr gezwungene Angaben nötig machen. In diesem Zusammenhang wären die Eigenschaften des noch unbekannten Cysteinhydantoins von Interesse.

Die Formulierung der Cystinhydantoinspaltung steht mit der Zersetzung von Cystin-*phenyl*-hydantoin im Einklang. J. C. ANDREWS und K. C. ANDREWS[36]) fanden dabei Brenztraubensäure, Phenylharnstoff, Schwefelwasserstoff und Schwefel, aber kein Ammoniak. Eine quantitative Aufarbeitung wurde nicht vorgenommen, nur den Phenylharnstoff isolierten sie in einer Ausbeute von 85% d. Th. *In ihrem Verhalten gegenüber Alkali nehmen also die cyclischen Derivate des Cystins eine besondere Stellung ein.*

Zum Schluß sei noch auf die Spaltung von SS-Glutathion durch Alkali, die ebenfalls quantitativ untersucht wurde, eingegangen. Die äußerst leichte und intensive H_2S-Abspaltung ist häufig bearbeitet worden[37]). Man hat aber dabei nie beachtet, daß zwischen der SH- und SS-Verbindung ein prinzipieller Unterschied in Bezug auf die Geschwindigkeit der H_2S-Abspaltung besteht. SCHÖBERL hat zuerst darauf hingewiesen[38]), *daß SS-Glutathion viel leichter zersetzt wird.* Die quantitativen Bestimmungen ergaben aus ihm 68,8% H_2S, 14,6% elem. S, 57,6% Cystin-NH_3, aber *keine SH-Verbindung.* Abgesehen von Cystinhydantoin ist also SS-Glutathion viel instabiler als alle bisher diskutierten Cystinderivate. Es ist nun in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal ein Peptid aufgefunden worden, das die Labilität des Schwefels im SS-Glutathion etwas verständlich macht, nämlich *Dicarbobenzoxy-cystinyl-diglycin.* Dieses Disulfid, das 50,8% H_2S, 25,2% elem. S und keine SH-Werte lieferte, unterscheidet sich gleichfalls von den anderen Cystinderivaten und gleicht in der Schwefelbilanz ganz dem SS-Glutathion. Die leichte Zersetzlichkeit dieser Substanzen dürfte auf den strukturellen Einbau des Cystins in der Mitte der

---

[35]) Ztschr. physik. Chem. 41, 601 (1902).

[36]) Journ. biol. Chem. 102, 253 (1933).

[37]) F. G. HOPKINS, Journ. biol. Chem. 270, 185 (1927); 84, 269 (1929); E. BRAND, M. SANDBERG, Journ. biol. Chem. 70, 381 (1926); C. MONCORPS, R. SCHMID, Ztschr. physiol. Chem. 205, 141 (1931); H. T. CLARKE, J. S. FRUTON, Journ. biol. Chem. 106, 667 (1934); B. CH. SAUNDERS, Biochem. Journ. 28, 1977 (1934).

[38]) Collegium VII, 412 (1936).

Kette zurückzuführen sein, wobei weder die NH_2-, noch die COOH-Gruppe von Cystin frei bleibt.

Auch bei der SS-Glutathionspaltung ist die Annahme einer Hydrolyse der SS-Bindung zulässig. Nur tritt hier deshalb eine Komplikation auf, weil SH-Glutathion selbst auch von Alkali zersetzt wird. Es ist also verständlich, wenn es in Spaltversuchen nicht nachgewiesen werden konnte[39]. Die Abspaltung von elementarem Schwefel scheint auf eine Nebenreaktion zurückzugehen. Wollte man sie nach BERGMANN erklären, müßte man die intermediäre Entstehung eines Ringsystems annehmen. Für die theoretische Deutung der Ergebnisse bedingt die Instabilität der SH-Verbindung neben den schon erwähnten, eine neue Schwierigkeit. Eine völlige Entwirrung der Verhältnisse beim Glutathionsystem wird daher sicher nicht einfach sein. Hier kam es in erster Linie auf den exakten Vergleich mit den anderen Cystinderivaten an.

Die vorliegende Arbeit wurde durch Stiftungen gefördert, die Herrn Dr. Schöberl gemacht wurden. Für diese Unterstützung möchte ich der *Deutschen Forschungsgemeinschaft in Berlin*, der *Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften an der Universität Würzburg*, der *Firma Hoffmann-La Roche* in Berlin und der *Firma Mannesmannröhrenwerke* in Düsseldorf-Rath danken.

[39]) Unter anderen Bedingungen gelang B. CH. SAUNDERS (l. c.) am Anfang einer Alkalispaltung von SS-Glutathion der colorimetrische Nachweis von SH-Glutathion mit Nitroprussidnatrium.

Experimenteller Teil.

I. Darstellung der Präparate.

1, Isocystin.

Trimetyhlenbromid. $Br—CH_2—CH_2—CH_2—Br$

Die Darstellung von Trimethylenbromid erfolgte nach einer bereits bekannten Vorschrift[1]. Die Reduktion des Broms zu Bromwasserstoff mit Schwefeldioxyd wurde entgegen der dortigen Angabe 5½ Stunden fortgesetzt und erwies sich trotzdem noch nicht als vollständig. 400 g (6 Mol) frisch destilliertes Trimethylenglykol wurden verarbeitet. Bei der anschließenden Destillation dauerte es gegen 3 Stunden, bis kein wasserunlösliches Produkt mehr überging. Reinigung des Trimethylenbromids nach der Vorschrift. Ausbeute 920 g mit dem Kp. 162°—165° (76% d. Th.).

γ-Brompropyl-phthalimid. (268) $C_8H_4O_2=N—CH_2—CH_2—CH_2Br$

Es wurde wie bei H. R. Ing und R. H. F. Manske[2] vorgegangen. Diese Vorschrift stellt eine Modifikation der Gabriel-Synthese von Aminen dar. Die Ausbeute nach der Extraktion war bei verschiedenen Ansätzen nur die Hälfte der Angabe. Das Produkt wurde zur Bestimmung des Schmelzpunktes aus siedendem Ligroin unter großem Verlust (50%) umkristallisiert. Es zeigten sich lange Nadeln vom F. 72°—73°[3], die sich schwer in Ligroin, kaum in Wasser, leicht in Alkohol und Äther lösen.

γ-Oxypropyl-phthalimid. (201) $C_8H_4O_2=N—CH_2—CH_2—CH_2OH$

Die Angaben von S. Gabriel[4] wurden in einigen Punkten etwas abgeändert. So wurde das Brompropyl-phthalimid in Methylalkohol statt Äthylalkohol gelöst und mit 10% mehr als der äquivalenten Menge Kalilauge (also 2,3 g KOH auf 10 g Brompropylphthalimid) 1 Stunde am Rückfluß gekocht. Der Alkohol wurde im Vakuum abdestilliert. Die anschließende Vakuumdestillation lieferte ein gelbliches Öl ($Kp._{14}$ 110° bis 115°).

---

[1]) Organ. Synth. I, 8.
[2]) Journ. chem. Soc. London 2348 (1926).
[3]) Alle Schmelzpunkte wurden stets im vorgeheizten Berl-Block ausgeführt.
[4]) B. 38, 630 (1905).

Es wurden z. B. erhalten aus 10 g (15 g) Brompropylphthalimid 4,2 g (7,7 g) Oxypropylphthalimid (55% und 68% d. Th.).

γ-Oxypropylphthalimid mit F. 75° ist schwer löslich in Wasser, Ligroin, Petroläther, leicht löslich in Alkohol, Benzol, Essigester. Aus Chloroform, Aceton, Tetrachlorkohlenstoff kristallisiert es leicht.

β-Phthalimido-propionsäure (215) $C_8H_4O_2{=}N{-}CH_2{-}CH_2{-}COOH$ (β-Phthalyl-alanin). Auch diese Substanz wurde wie bei S. GABRIEL hergestellt und hatte den dort angegebenen F. 150°—151°. Die Ausbeute betrug nach der Umkristallisation rund 60% d. Th. (Mutterlaugen nicht vernachlässigen!)

Nebenbei wurde versucht, β-Phthalyl-alanin aus β-Alanin (erhalten nach E. ABDERHALDEN und A. FODOR[5]) und Phthalsäureanhydrid durch Zusammenschmelzen herzustellen. Da nach viermaligem Umkristallisieren aus Wasser der Schmelzpunkt nur 142° zeigte, wurde die Kondensation nicht weiter mehr verfolgt[6].

β-Phthalimido-α-brompropionsäure (296) $C_8H_4O_2 \cdot N{-}CH_2{-}CHBr{-}COOH$

Nach S. GABRIEL[7]) lassen sich Phthalimido-fettsäuren nach der Hell-Volhard-Zelinsky-Methode bromieren. Dies ist auch für β-Phthalyl-alanin durchgeführt worden.

Bei einigen Ansätzen wurde ein Kristallpulver mit dem angeführten F. 167°—170° erhalten. Die Ausbeute war höher als die von GABRIEL erzielte. Z. B. aus 15 g (3,7 g) Phthalyl-β-alanin 15,95 g (4,4 g) 77,5 (86,0) % d. Th. Bei einem Ansatz entstand beim Ausfällen neben der Kristallmasse am Boden noch ein gelbes Öl, das nach dem Abtrennen fest wurde. Schmp. der Kristallmasse 154°, Schmp. des festgewordenen Öles 155°. Durch Nachbromieren konnte der Schmp. auf 162° erhöht werden.

Di-β-phthalimido-dithio-dilactylsäure (500,4) $\left[C_8H_4O_2 \quad N{-}CH_2{-}CH(COOH){-}S{-}\right]_2$

Es wurde der Versuch gemacht, β-Phthalimido-α-brompropionsäure in das Disulfid überzuführen. 1 g Säure, in 5 ccm Wasser suspendiert, wurden zu 0,18 g Soda — ebenfalls in 5 ccm Wasser gelöst — gegeben. Da die Säure nur schlecht in Lösung ging, fügte man noch etwas Na_2CO_3 zu. Diese Säurelösung versetzte man mit der äquivalenten Na_2S_2-Menge in 12 ccm H_2O (aus $Na_2S \cdot 9\,H_2O$ + S in der Hitze dargestellt; 10% Überschuß). Die gelbe Farbe des Natriumdisulfides blieb zunächst, aber beim Stehen trübte sich die Lösung und wurde völlig undurchsichtig. Auf

[5]) Ztschr. physiol. Chem. 85, 114 (1913).

[6]) Inzwischen hat sich Herr cand. chem. H. BRAUN in unserem Institut erneut mit dieser Kondensation beschäftigt und deren quantitativen Verlauf gezeigt.

[7]) B. 40, 2647 (1907).

dem Wasserbad wurde sie in 30 Minuten unter Absetzen von etwas Schwefel klar (bei einem Ansatz blieb die Trübung), trübte sich jedoch beim Erkalten wieder. Nach dem Filtrieren wurde das Disulfid mit verdünntem H_2SO_4 ausgefällt, wobei es sich zu einer zähen, öligen Masse zusammenballte, die im Exsiccator fest wurde. Einengen des Filtrates lieferte noch mehr von der klebrigen Masse. So wurden aus je 5 g Phthalimido-α-brompropionsäure 2,5 g eines bräunlichen Pulvers erhalten. Umkristallisation aus CS_2, Benzol, Äther usw. gelang nicht. Die Beilsteinprobe ist negativ, mithin kein Brom mehr vorhanden.

Mit alkalischer Plumbitlösung erhält man PbS-Abspaltung als ein Zeichen für das Vorliegen einer SS-Bindung. Nitroprussidnatrium gibt nach Hydrolyse mit NaOH, Ansäuern mit HCl, Wegkochen von H_2S und Versetzen mit NH_3, Violettfärbung.

Zur Identifizierung der Substanz wurden Schwefelbestimmungen durchgeführt und zwar zunächst durch nasse Veraschung in alkalischer Lösung[8]).

0,0552 g Substanz: 0,0624 g $BaSO_4$ — 0,0546 g Substanz: 0,0630 g $BaSO_4$.
$C_{22}H_{16}O_8N_2S_2$ (500,4) Ber. S 12,8% Gef. S 15,53%; 15,85%

Weitere Schwefelbestimmungen wurden im Quarzrohr nach A. Schöberl ausgeführt[9]).

0,0997 g Substanz: 0,1145 g $BaSO_4$; 0,0981 g Substanz: 0,1019 g $BaSO_4$. (Nach Auskochen der Substanz mit CS_2); 0,1038 g Substanz: 0,1151 g $BaSO_4$ (mit CS_2 nochmals extrahiert).

Ber. S 12,8% Gef. S 15,77%; 15,27%; 15,23%.

Isocystin-chlorhydrat. $[H_2N—CH_2—CH(COOH)—S—]_2 \cdot HCl \cdot H_2O$

Der Phthalsäurerest sollte nun mit HCl abgespalten werden, wie dies W. Coblenz und S. Gabriel[10]) und J. v. Braun, A. Bahn, W. Münch[11]) bei anderen Disulfiden schon durchgeführt haben.

2,3 g Diphthalimido-dithio-dilactylsäure wurden im Bombenrohr mit 9,5 ccm konz. HCl 3 Stunden auf 155°—165° erhitzt. Nach dem Erkalten waren schwärzliche Kristalle und eine braune Flüssigkeit vorhanden. Es war also teilweise Zersetzung eingetreten.

Die Kristalle (0,95 g) wurden in 20 ccm Wasser gelöst und mit Tierkohle entfärbt, wobei schöne weiße Kristalle (0,7 g) entstehen, die einen Schmelzpunkt von 202° besitzen. Es lag also Phthalsäure vor.

Die braune Flüssigkeit gab mit alkalischer Plumbitlösung einen PbS-Niederschlag, worauf die SS-Bindung schließen ließ. Hydrolyse mit NaOH und Ansäuern mit HCl gab schwache Trübung durch Schwefel. Nach Verkochen des H_2S wurde mit NH_3 alkalisch gemacht und mit Nitro-

[8]) H. Waelsch, G. Klepetar, Ztschr. physiol. Chem. 211, 47 (1932); vergl. später.
[9]) Angew. Chem. 50, 344 (1937).
[10]) B. 24, 1122 (1891).
[11]) B. 62, 2766 (1929).

prussidnatrium geprüft. Es entstand Violettfärbung, was das Vorliegen einer SH-Verbindung beweist.

Die wässerige Lösung wurde nach Durchschütteln mit Tierkohle bei 45°—50° im Vakuum eingeengt. Es blieb eine gelbbraune, äußerst zähe Masse zurück. Sie gab ebenfalls mit Plumbit einen schwarzen PbS-Niederschlag und ferner mit Quecksilbersalz-Lösung eine Fällung.

Ein weiterer Versuch, den Phthalsäurerest bei nur 125° im Bombenrohr abzuspalten, zeigte, daß außer Phthalsäure noch unzersetzte Substanz vorhanden war und die Abspaltung einer höheren Temperatur bedarf.

Bestimmung des Gehaltes an Isocystinchlorhydrat: Zunächst wurde die farblose Lösung von Isocystinchlorhydrat auf 100 ccm verdünnt.

a) 10 ccm wurden abpipettiert, mit wenig Zinkstaub versetzt und zur Reduktion eine Stunde stehen gelassen. Nachdem man noch 5 Minuten auf dem Wasserbad erwärmte, wurde filtriert und mit n-HCl quantitativ nachgespült. Es entstand so eine Lösung von Isocystin, die man mit 0,1 n-Jod titrierte. Jodverbrauch: 1,18 ccm 0,1 n-J = 15 mg Isocystin. Ein weiterer Reduktionsversuch mit 30 Minuten langem Erwärmen auf dem Wasserbad ergab noch weniger Jodverbrauch und zeigte, daß Zinkstaub zur Reduktion ungeeignet ist.

b) Weitere 10 ccm wurden mit dem Cadmium-Reduktor reduziert. Jodverbrauch 2,68 ccm 0,1 n-J = 32,4 mg Isocystin. In 1 ccm Lösung also 3,24 mg.

c) Colorimetrische Bestimmung nach O. Folin, A. D. Marenzi, S. H. Tompsett[12]) im Leitz-Colorimeter mit 1 ccm Substratlösung. Zur Vergleichslösung wurde 1 ccm einer 0,005 mol. Cystinlösung in 0,05 n-H_2SO_4 mit 1,2 mg Cystin benutzt. Bei Einstellung der Reaktionslösung auf 20 ergab sich für die Vergleichslösung ein Mittel von 52,4. 20 : 52,4 = 12 : x. In 1 ccm Lösung waren also 3,14 mg Isocystin.

Die Reduktion mit Cadmium und die colorimetrische Bestimmung lieferten also gut übereinstimmende Werte. Es wäre möglich, diese Isocystin-chlorhydratlösung direkt zur Aufklärung des Verhaltens des Disulfides zu benutzen.

Isocystin. (240,3)

Eine Weiterverarbeitung von Isocystin-jodhydrat zu Isocystin wurde von S. Gabriel durchgearbeitet[13]). Es wurde nun versucht, aus dem vorher beschriebenen Isocystin-chlorhydrat nach denselben Angaben zum Ziele zu gelangen. Dabei wurden folgende andere Feststellungen gemacht.

Das Eintrocknen zu einem dunklen Brei bei gewöhnlicher Temperatur dauerte einen ganzen Tag. Es wurde in 20 ccm heißem Wasser gelöst, mit

[12]) Biochem. Journ. 25, 2014 (1931). — Vergleichslösung: 1 ccm Cystinlösung + 2 ccm frischer 20prozentiger Na_2SO_3-Lösung. Nach 1 Minute 20 ccm ges. $NaHCO_3$ und 8 ccm Folin-Marenzi-Reagens zufügen. Nach 8 Minuten mit Wasser auf 100 ccm auffüllen. — Reaktionslösung: An Stelle der bekannten Cystinlösung die Substratlösung.

[13]) B. 38, 640 (1905).

Tierkohle gekocht, auf dem Wasserbad und zuletzt im Vakuum eingeengt. Es bildete sich keine Kristallmasse, sondern eine schmierige, braunrote Masse mit NH_4Cl-Kristallen. Eine Isolierung des Isocystins gelang nicht. Ein Versuch, mit Ag_2CO_3 das Halogen zu entfernen, scheiterte, da sofortige Spaltung unter Ag_2S-Bildung eintrat. Dies weist auf die enorme Empfindlichkeit des Disulfides hin.

Aus allen Versuchen, auf diese Weise zum Isocystin zu kommen, geht hervor, daß diese Methode in der vorliegenden Form zur Erreichung des Zieles praktisch nicht in Frage kommt. Zur Darstellung genügender Mengen muß ein anderer Weg eingeschlagen werden[14].

2. l-Cystin (II).

Cystin kann aus den Keratinen, die reich an Cystin sind, durch Hydrolyse gewonnen werden. Zur Herstellung dienen Schweineborsten, Pferdehaare, Schafwolle und Menschenhaare.

Da ich Cystin als Ausgangsmaterial für meine Präparate in größeren Mengen benötigte, kam ich bald von der zuerst gebrauchten Methode ab[15] und arbeitete Ziegenhaare, die in größerer Menge zur Verfügung standen so auf, wie es auch A. Weidinger[16] kürzlich berichtet hat.

Die Ziegenhaare wurden mit der vierfachen Menge 20proz. HCl versetzt und bei 120° am Rückfluß 6 Stunden erhitzt. Die Biuretreaktion ist dann negativ. Zu lange Hydrolyse ist stets zu vermeiden. Die Mischung filtrierte man am besten heiß und wusch den unlöslichen Rückstand gut mit Wasser. Das Filtrat wurde im Vakuum bei 55°—60° stark eingeengt, noch zweimal mit Wasser aufgenommen und wieder eingeengt, um einen großen Teil der HCl zu entfernen. Die heiße Lösung wurde nun mit festem Natriumacetat völlig abgestumpft. Im Filterstutzen schied sich dann bei fleißigem Reiben mit einem Glasstab in ungefähr drei Tagen das Cystin in dicken Krusten an der Wandung und als Bodensatz ab. Der dunkelgefärbte Niederschlag wurde abgesaugt, gut mit heißem Wasser gewaschen und mit Alkohol und Äther getrocknet. Dann löste man in der etwa benötigten Menge 4proz. HCl, verdünnte mit Wasser (bei 1 kg Haare etwa 2 Liter) und entfärbte *in der Kälte* mit Tierkohle (Carboraffin) durch langes Schütteln auf der Maschine. Wenn nötig, ist die Tierkohle zu erneuern. Die abfiltrierte und gut gewaschene Tierkohle muß unbedingt mit wenig 4proz. HCl einige Male ausgekocht werden, um das adsorbierte Cystin völlig herauszulösen. Die vereinigten, wasserklaren oder schwach gelben Filtrate wurden nun im Vakuum bei 55°—60° erneut bis auf ein kleines Volumen eingeengt und wenn nötig, nochmals durch ein Falten-

[14] Herr cand. chem. H. Braun untersucht zur Zeit im hiesigen Institut verschiedene Isocystinsynthesen. Die Zugänglichkeit von Isocystin ist aus verschiedenen Gründen von Interesse.

[15] Organ. Synth. V, 39. Verwendet wurden hier von mir Schweineborsten, die in lauwarmem Wasser mit Seife tüchtig gewaschen worden waren.

[16] Recueil des Traveaux Chimiques des Pays bas 56, 562 (1937).

filter gegossen. Dann versetzte man die noch heiße Lösung mit einer gesättigten, warmen Natriumacetat-Lösung, bis Kongopapier nicht mehr gebläut wurde. Das nun völlig weiße Cystin fällt beim Umrühren sofort aus. Die Cystinausfällung vervollständigte man schließlich durch Acetonzusatz (einige hundert ccm). Nach zwei Tagen wurde abgesaugt, mit Wasser ordentlich gewaschen, um Spuren von Tyrosin und Natriumacetat zu beseitigen und im Exsiccator über H_2SO_4 getrocknet. Das sehr reine Cystin kann nochmals aus salzsaurer Lösung mit Acetat gefällt werden. Ausbeute ziemlich quantitativ.

Analyse: 0,1158 Substanz: 0,2243 g $BaSO_4$ — 0,0048 g Substanz: 1,12 ccm N_2 (17°, 748 mm, Blindwert 0,14 ccm N_2, Mikro-van Slyke) $C_6H_{12}O_4N_2S_2$ (240,3) Ber. S 26,70% Gef. S 26,60% N 5,82% N 5,79%

3. Cysteinchlorhydrat (IIa).

Die Herstellung erfolgte gemäß nachstehender Angabe[17]:

10 g Cystin werden in 10 ccm Wasser suspendiert und 20 ccm konz. HCl dazugefügt. Ferner wurden 6 g Zinn zugegeben. Die Reaktion erfolgt langsam und ist durch vorsichtiges Erwärmen auf dem Dampfbad zu beschleunigen. Erst nach völliger Reduktion des Cystins beobachtet man H_2-Entwicklung. Die Flüssigkeit wird sodann mit 20 ccm Wasser von unverbrauchtem Metall abdekantiert. Das gelöste Zinn entfernt man völlig mit H_2S (prüfen!). Nach Abfiltration vom SnS wird die Lösung auf dem Wasserbad zur Trockne verdampft.

Einige Beobachtungen und kleine Änderungen mögen hier mitgeteilt sein. Bei Verwendung der angegebenen Menge konz. HCl ergab sich ein dicker Niederschlag von unlöslichem Cystin-chlorhydrat, was eine weitere Zugabe von Wasser nötig machte. Da auf dem Wasserbad erhitzt wurde, zeigte sich schon nach wenigen Stunden H_2-Entwicklung. Trotzdem wurde aber vorsichtshalber einen ganzen Tag reduziert. Zur Entfernung des Zinns muß stark verdünnt werden. Im H_2-Strom wurde im Vakuum eingedunstet und dann im Exsiccator gut getrocknet.

Das Rohprodukt wurde nach O. Warburg[18] gereinigt. Die Kristalle werden im Mörser mit Aceton möglichst fein zerrieben, abgesaugt und dasselbe nochmals wiederholt, bis das Aceton farblos bleibt. Alle Spuren von Schwermetallen, besonders von Eisen, sind dann entfernt. Eine Umkristallisation nach M. Bergmann und G. Michalis[19] schließt sich an: Das getrocknete Pulver wird in wenig (5 ccm) 5n-HCl aufgenommen. Beim Erkalten kristallisiert salzsaures Cystein mit 1 Mol Kristallwasser in farblosen Nadeln fast quantitativ aus. Es erfolgt nochmalige Behandlung nach O. Warburg, worauf an der Luft getrocknet wird. Keinesfalls darf

[17]) C. A. Morrow, Biochem. Laboratory Methods for Students of the Biol. Sciences, 88.

[18]) Biochem. Ztschr. 187, 255 (1927).

[19]) B. 63, 987 (1930).

die Substanz nun in den Exsiccator kommen, da sie sonst Wasser und damit ihre geforderte Zusammensetzung verliert. Ausbeute 8,5 g.
Analyse: 0,0553 g Substanz: 3,23 ccm 0,1n-KJO_3 (ber. 3,14 ccm) — 0,0935 g Substanz: 0,1246 g $BaSO_4$
$C_3H_{10}O_3NSCl$ (175,6) Ber. S 18,20% Gef. S 18,30%

4. Dithio-dihydracrylsäure (V).

Das mehrfach umkristallisierte Präparat war bereits früher mehrfach durchanalysiert.

5. l-Cystinhydantoin (VI).

Dieses Cystinderivat wurde nach den Angaben von W. C. Hess[20] hergestellt. 4 g Cystin schlämmte man in 20 ccm heißem Wasser auf und gab eine konz. Lösung von 3 g KCNO zu. Einige Minuten kochen, bis Lösung eingetreten ist. Mit 50 ccm 10proz. HCl ansäuern und 30 Minuten unter Rückfluß kochen. Es fiel bald ein weißer Niederschlag aus, der heftiges Stoßen verursacht. Nach völligem Erkalten wurde filtriert und mit heißem Wasser gewaschen. Man erhält ein staubtrockenes, schneeweißes Pulver. Ausbeute 3 g (63% d. Th.).
Analyse: 0,0714 g Substanz: 0,1393 g Benzidinsulfat.
$C_8H_{10}O_4N_4S_2$ (290,25) Ber. S 22,10% Gef. S 22,17%

6. Dibenzoyl-l-cystin (VII).

Dieses Cystinderivat wurde von I. Barrit[21] bearbeitet. 0,24 g Cystin gelöst in 2 ccm n-NaOH (2 Mole), werden mit 5 ccm Wasser und 2 g Natriumbicarbonat versetzt. Unter heftigem Schütteln fügt man nun im Verlauf von 2 Stunden 1,7 g (1,4 ccm = 12 Mole) Benzoylchlorid zu. Dann wird filtriert, gut gewaschen, mit 2n-H_2SO_4 angesäuert und 24 Stunden in der Kälte stehen gelassen. Die weiße Kristallmasse saugt man ab, wäscht sie und trocknet im Exsiccator. Das feingepulverte Gemisch von Benzoyl-cystin und Benzoesäure zieht man mehrmals mit heißem Benzol aus, um die Benzoesäure herauszulösen. Ausbeute 0,27 g (60% d. Th.) F. 178,5°.

Ich ging aus von 8 g Cystin in 67 ccm n-NaOH, 170 ccm Wasser, 67 g Natriumbicarbonat und 56,8 g Benzoylchlorid. Die angegebene Menge $NaHCO_3$ löste sich bei weitem nicht und schon mit ganz wenig Benzoylchlorid wurde alles fest. Außerdem trat starke Schaumbildung auf. Der Niederschlag konnte nur sehr schlecht filtriert werden und auch nach Waschen mit viel Wasser gab er noch mit alkalischer Bleisalzlösung und auch mit Folin-Reagens eine positive Reaktion auf Disulfid[22]. Die Lösung wurde angesäuert, wobei ein schaumiger Niederschlag entstand, der einen Tag im Eisschrank blieb. Die abgesaugte Masse wurde nach dem Waschen

[20]) Journ. Am. Soc. 56, 1421 (1934); vergl. J. C. Andrews, Journ. biol. Chem. 105, IV (1934).
[21]) Journ. Soc. of chem. Ind. 1927, 388 t.

zwischen Filtrierpapier, auf dem Tonteller und zuletzt im Exsiccator getrocknet. Die trockene Substanz (37 g) ergab nach dem Ausziehen mit heißem Benzol 5 g Benzoyl-cystin (33% d. Th.).

Da der Schmelzpunkt nicht stimmte, wurde in Alkohol gelöst, wobei eine rotbraune Lösung entstand. Aus dieser Lösung kristallisierte reines Benzoyl-cystin aus, das nach der Abtrennung einen F. 184° zeigte. Auch aus der Mutterlauge kann man weitere Mengen bekommen, die beim Waschen mit Alkohol völlig weiß werden.

Benzoyl-cystin fällt aus Eisessig, in dem es leicht löslich ist, als Gallerte aus. Aus Äthylalkohol kristallisiert es. Fällung mit Wasser gibt aber ebenfalls eine Gallerte. Aus der wässerigen Lösung, die einen Überschuß an NaOH enthält, kristallisiert das Na-Salz in glänzenden Kristallen aus.

Analyse: 0,0546 g Substanz: 0,0568 g $BaSO_4$

$C_{20}H_{20}O_6N_2S_2$ (448,3) Ber. S 14,30% Gef. S 14,29%

7. Diformyl-l-cystin (VIII).

Eine Beschreibung dieser Substanz findet man bei J. S. Fruton und H. T. Clarke[23]). 6 g Cystin werden in 90 ccm 90proz. Ameisensäure gelöst und dann 30 ccm Essigsäureanhydrid zugegeben. Nach zweistündigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur wird die Mischung mit Wasser verdünnt und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der farblose Rückstand wiegt nach Waschen mit wenig kaltem Wasser 5,2 g. Er wird mit 60 ccm Wasser umkristallisiert. Ausbeute 3 g. F. 187°—188° unter Zersetzung.

Bei Verwendung von 20 g Cystin erhielt ich 11 g Diformyl-cystin. Die Reaktionslösung war über Nacht stehen geblieben, wobei ein weißes Pulver ausfiel, dessen Menge durch Einengen der Lösung nur wenig erhöht werden konnte. Das Eintrocknen im Vakuum erwies sich als überflüssig. Bei einer weiteren Herstellung konnte ich beobachten, daß schon 1 Stunde nach Zugabe des Anhydrides die Ausscheidung beginnt und immer stärker wird. Verdünnt man nach 8 Stunden mit Wasser und läßt einen weiteren Tag stehen, kann man absaugen, ohne überhaupt einengen oder zur Trockne verdampfen zu müssen.

Analyse: 0,0920 g Substanz: 0,1770 g Benzidinsulfat — 0,00886 g Substanz: 6,04 ccm; 5,92 ccm 0,01 n-HCl (*Mikro-Kjeldahl*)[24])

$C_8H_{12}O_6N_2S_2$ (296,28) Ber. S 21,6% Gef. S 21,86%

N 9,45% N 9,53%; 9,35%.

---

[22]) Es dürfte das Na-salz von Benzoyl-cystin vorgelegen haben.

[23]) Journ. biol. Chem. 106, 867 (1934).

[24]) Mikro-Kjeldahl: Die Bestimmung wurde in einer etwas abgeänderten Destillationsapparatur nach F. A. Hoppe-Seyler: Mikrochemie Bd. X, 446 (1931) ausgeführt (nur Schliffverbindungen). Die zu allen Veraschungen verwendete konz. H_2SO_4 enthält in 1 ccm 5 mg Selen. Die Veraschungen verliefen stets ausgezeichnet. Hier wurden 0,0443 g Substanz eingewogen, mit 5 ccm H_2SO_4 verascht, dann

8. Dibrom-propionyl-l-cystin (IX).

Darstellungen dieser Substanz sind angegeben von E. Fischer und U. Suzuki[25]), E. Abderhalden und E. Wybert[26]), E. Abderhalden und W. Köppel[27]). Die Angaben wurden im wesentlichen befolgt.

Das Rohprodukt wurde zur Reinigung in Essigester gelöst, die Lösung durch Filtration über eine hohe Schicht Tierkohle entfärbt und mit absolutem Äther gefällt. Das gut ausgewaschene und völlig weiße Produkt fällte man zur Analyse nochmals um. Das Lösungsmittel wird hartnäckig zurückgehalten und kann nur im Hochvakuum bei höherer Temperatur (65°) völlig entfernt werden. Dabei sintert die Substanz zusammen und verliert 30% an Gewicht. Das so erhaltene Dibrom-propionyl-cystin hat den mitgeteilten Schmelzpunkt 146°.

Analyse: 0,0780 g Substanz: 0,0724 g $BaSO_4$
$C_{12}H_{18}O_6N_2S_2Br_2$ (510,14) Ber. S 12,55% Gef. S 12,75%

9. Dialanyl-l-cystin (X).

Diese Substanz, die aus Dibrom-propionyl-cystin und konz. NH_3 hergestellt wird, ist in der Literatur bei den schon unter Dibrom-propionyl-cystin angeführten Stellen beschrieben.

Zur Reinigung des aus viel Methylalkohol gefällten Rohproduktes mußte man in heißem Wasser lösen, wieder einengen und über Schwefelsäure im Vakuumexsiccator völlig verdunsten. Man erhielt die Substanz so in Kristallen (feine Nadeln). Sie wurde ebenfalls in der Trockenpistole bei 65° (Methanol) im Hochvakuum getrocknet. Das Präparat wird bei 200° gelb und zersetzt sich bei weiterem Ansteigen der Temperatur.

Analyse: 0,0465 g Substanz: 0,0567 g $BaSO_4$ — 0,0477 g Substanz: 0,0587 g $BaSO_4$
$C_{12}H_{22}O_6N_4S_2$ (382,36) Ber. S 16,75% Gef. S 16,75% 16,90%

10. Dichlor-acetyl-l-cystin (XI).

Seine Herstellung beschreiben E. Abderhalden und H. Spinner[28]). Bei der Zugabe von Chloracetylchlorid trat nur geringe Temperaturerhöhung auf. Nach dem Ansäuern war die Lösung noch braungelb gefärbt und es entstand kein Harz, so daß beim Filtrieren kaum ein Rückstand blieb. Aus 22 g Cystin wurden 23 g Dichlor-acetyl-cystin gewonnen (59% d. Th.). Einmaliges Umlösen aus Essigester lieferte 18 g. F. 136° (Lit. 137°—139°).

---

mit Wasser auf 25 ccm aufgefüllt und je 5 ccm (0,00886 g) zur Bestimmung benutzt.

[25]) B. 37, 4575 (1904).
[26]) B. 49, 2449 (1916).
[27]) Ferm. 9, 516 (1928).
[28]) Ztschr. physiol. Chem. 106, 296 (1919).

Zur Analyse wurde ein zweites Mal umkristallisiert.

Analyse: 0,0485 g Substanz: 0,0584 g $BaSO_4$ — 0,0522 g Substanz: 0,0625 g $BaSO_4$ — 0,00682 g Substanz: 3,53 ccm 0,01 n-HCl (Mikro-Kjeldahl)

$C_{10}H_{14}O_6N_2Cl_2S_2$ (393,16) Ber. S 16,31% Gef. S 16,54% 16,44%

N 7,13% N 7,24%

11. Diglycyl-l-cystin (XII).

Vom Dichlor-acetyl-cystin kommt man nach E. Abderhalden und H. Spinner[29]) zum Diglycyl-cystin. Da bei Zugabe von NH_3 eine beträchtliche Wärmelösung auftritt, wurde von N. W. Pirie[30]) diese Methode abgeändert. Man gab das NH_3 unter Kühlung zu. Dann blieb die Lösung 4 Tage bei 37° stehen. An Stelle von Ag_2SO_4 fand Ag_2CO_3 (3,6 g auf 5 g Dichlor-acetyl-cystin) Verwendung. Nach Abfiltration des Ag_2S wurde sofort eingedampft. Den gelben Sirup versetzte man mit Methanol (100 ccm), wobei eine klebrige, zähe Masse ausfiel, die nach kurzem Reiben fest wurde und zu einem Pulver zerstoßen werden konnte. Man dekantierte ab und übergoß nochmals mit Methanol (40 ccm). Nach 2 Stunden wurde das gelbe Pulver abgenutscht und eine Ausbeute von 3,4 g (75% d. Th.) erzielt. Ein zweiter Ansatz lieferte aus 7,5 g Cystin 5,8 g Diglycyl-cystin (97,3% d. Th.).

Da das Präparat noch nicht rein war, wurde in ganz wenig Wasser gelöst, mit Tierkohle geschüttelt, mit Methanol gefällt und im Hochvakuum getrocknet. Intensives Trocknen in der Trockenpistole bei 65° im Hochvakuum erwies sich als dringend notwendig. Die Substanz ist sehr hygroskopisch.

Analyse: 0,0536 g Substanz: 0,0666 g $BaSO_4$ — 0,000604 g Substanz: 6,43 ccm 0,01 n-HCl (Mikro-Kjeldahl)

$C_{10}H_{18}O_6N_4S_2$ (354,3) Ber. S 18,09% Gef. S 17,07%

N 15,80% N 14,44%

Da das Präparat bezogen auf S- und N-Gehalt nur etwa 94% rein war, wurde versucht nach N. W. Pirie zu reinigen. Man löste zu diesem Zweck das Diglycyl-cystin in H_2SO_4, reduzierte mit Zinkstaub und fällte mit Cu_2O das Cupromerkaptid. Dieses wurde dann mit H_2S zersetzt, wobei CuS und Glycyl-cystein entstehen. Das Glycyl-cystein sollte nun mit H_2O_2 wieder zum Disulfid oxydiert werden. Auf 7,5 g Glycyl-cystein benötigt man 4,4 g 5proz. H_2O_2 (5% Überschuß). Die Oxydation der oben enthaltenen und von H_2S befreiten Glycyl-cystein-Lösung vollzog sich momentan. Beim Eindunsten entstand eine gelbe Masse, die nach dem Pulverisieren und Trocknen folgende Schwefelwerte gab:

Analyse: 0,0460 g Substanz: 0,0674 g $BaSO_4$ — 0,0517 g Substanz: 0,0749 g $BaSO_4$

Ber. S 18,09% Gef. S 20,03%; 19,9%

[29]) Siehe Dichlor-acetyl-l-cystin.

[30]) Biochem. Journ. 25, 614 (1931).

Die zu hohen S-Werte sind auf anhaftende H_2SO_4 zurückzuführen, deren völlige Entfernung sehr schwierig ist. Der anorganische Schwefel wurde durch Fällung des Präparates in salzsaurer Lösung mit $BaCl_2$ nachgewiesen. Die Fällung als Cupromerkaptid ist mithin zur Reinigung nicht gut geeignet. Bei einer erneuten Darstellung wurde auf sie wiederum verzichtet[31]). Von dem einmal umgefällten Produkt ermittelte man nach eintägigem Trocknen im Hochvakuum bei 65° den Reinheitsgrad durch S- und N-Bestimmung:

Analyse: 0,0513 g Substanz: 0,0647 g $BaSO_4$ — 0,00624 g Substanz: 6,81 ccm 0,01 n-HCl (Mikro-Kjeldahl)

$C_{10}H_{18}O_6N_4S_2$ (354,3) Ber. S 18,09% Gef. S 17,32% (95,6% d. Th.)

N 15,80% N 15,30% (96,8% d. Th.)

Das zu den Versuchen benutzte Diglycyl-cystin ist also 96prozentig. Bei den Spaltungsversuchen wurde entsprechend mehr eingewogen.

12. Dicarbobenzoxy-l-cystin (XIII).

Die Darstellung dieser Verbindung aus Cystin in alkalischer Lösung und Benzylesterkohlensäure-chlorid ist von M. Bergmann und L. Zervas[32]) angegeben. Nach dieser Vorschrift entstand bei der Kuppelung stets eine milchige Trübung. Die Essigesterlösung wurde vor dem Abdampfen mit Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt, das zwischen 100° und 130° schmolz, wurde nochmals in heißem Chloroform aufgenommen. Beim Erkalten und Abkühlen schieden sich die Kristalle mit F. 124° aus. Während einmal aus 21,6 g Cystin 20 g Dicarbobenzoxy-cystin entstanden, wurden ein anderes Mal nur 8 g erhalten. Hier trat ein beim Ausschütteln in Essigester unlösliches Nebenprodukt (5 g) auf, das wohl mit alkalischer Plumbitlösung einen PbS-Niederschlag gab, das aber weder Cystin noch Dicarbobenzoxy-cystin sein konnte.

Analyse: 0,0697 g Substanz: 0,0642 g $BaSO_4$ — 0,0539 g Substanz: 0,0487 g $BaSO_4$ — 0,006848 g Substanz: 2,56 ccm 0,01 n-HCl (Mikro-Kjeldahl)

$C_{22}H_{24}O_8N_2S_2$ (508,3) Ber. S 12,61% Gef. S 12,61% 12,41%

N 5,51% N 5,24%

Dicarbobenzoxy-cystin gibt in alkalischer Lösung ein in der Kälte schwer lösliches Bleisalz. Ein Vergleichsversuch zeigt, daß Dicarbobenzoxy-cystin leichter als Cystin von Alkali gespalten wird.

---

[31]) Zur Halogenentfernung wurde diesmal Ag_2SO_4 benutzt.

[32]) B. 65, 1192 (1932).

13. Dicarbobenzoxy-l-cystinyl-diglycin (XIV).

Zunächst mußte Dicarbobenzoxy-cystinyl-dichlorid hergestellt werden. Bei der Darstellung ist wesentlich, Dicarbobenzoxy-cystin und PCl_5 möglichst fein zu pulvern. Im übrigen nach J. WHITE[33]. Wegen der Empfindlichkeit des Säurechlorides gegen Feuchtigkeit ist es vorteilhaft, es zu zentrifugieren, statt zu filtrieren. Im Zentrifugenglas zweimal mit Äther waschen und dann sofort weiterverarbeiten. Das Säurechlorid löst sich in der alkalischen Lösung von Glycin nur langsam. Geht man von 3 g Glycin in 27 ccm n-NaOH aus, so braucht man gegen 3 Stunden, um die entsprechende Menge Säurechlorid (aus 2,86 g Dicarbobenzoxy-cystin hergestellt) in Lösung zu bringen. Dabei müssen im Laufe der Zeit noch gegen 15 ccm n-NaOH zugegeben werden. Nach dem Ansäuern erhält man 2,45 g Rohprodukt, das intensiv getrocknet werden muß, da es Wasser sehr fest zurückhält. Die Substanz bildet ein weißes, lockeres Pulver.

Zur Reinigung löst man 0,9 g Rohprodukt in etwa 10 ccm Alkohol, filtriert und versetzt in der Hitze mit viel Wasser (gegen 50 ccm). Im Eisschrank läßt man 2 Stunden stehen. Die Lösung erstarrt zu einer gallertartigen Masse, die abgesaugt und gut mit Wasser gewaschen wird. Die Substanz muß im Hochvakuum gut getrocknet werden. F. 168° (jedoch vorheriges Erweichen). Lit. 161°—163°. Ausbeute 0,75 g.

Analyse: 0,0454 g Substanz: 0,0348 g $BaSO_4$ — 0,00463 g Substanz: 2,86 ccm 0,01 n-HCl (Mikro-Kjeldahl)

$C_{26}H_{30}O_{10}N_4S_2$ (622,39) Ber. S 10,30% Gef. S 10,53%
N 9,00% N 8,65%

Im Gegensatz zu Diglycyl-cystin zeigt Dicarbobenzoxy-cystinyl-diglycin schon bei gewöhnlicher Temperatur mit alkalischer Plumbitlösung einen PbS-Niederschlag.

14. l-Cystinyl-diglycin (XV).

2,0 g Dicarbobenzoxy-cystinyl-diglycin wurden nach der Vorschrift von J. WHITE[34] mit 20 ccm konz. HCl bei 60° in einer ½ Stunde zersetzt. Der abgespaltene Benzylalkohol wurde nach dem Verdünnen mit 130 ccm Wasser durch mehrmaliges Ausäthern entfernt. Aus der wässerigen Schicht mußte nun der gelöste Äther unbedingt erst im Vakuum entfernt werden. Die wässerige Lösung ließ man aus einem Tropftrichter langsam zu einer Lösung von 5 g Phosphorwolframsäure in wenig Wasser fließen. Es entsteht ein gelblich-weißer Niederschlag. Nach einstündigem Stehen in Eis wurde abzentrifugiert. Den Phosphorwolframsäure-Niederschlag suspendierte man in 100 ccm Wasser und versetzte mit 1 ccm konz. HCl. Äußerlich ist keine Zersetzung erkennbar. Die Mischung wurde viermal mit je 50 ccm Amylalkohol-Äther (1 : 1) tüchtig durch-

[33]) Journ. biol. Chem. 106, 141 (1934); vergl. H. S. LORING, DU VIGNEAUD, Journ. biol. Chem. 111, 385 (1935).

[34]) Journ. biol. Chem. 106, 141 (1934).

geschüttelt. Aus der getrübten, wässerigen Lösung wurde der Äther wieder im Vakuum abgeblasen. Dann setzte man etwa 1,5 g MgO zu und schüttelte im Scheidetrichter tüchtig durch. Etwas MgO muß stets ungelöst bleiben. Die filtrierte Lösung engte man im Vakuum bei 40°—45° ein. Nach J. WHITE wurde nun in ganz wenig Wasser gelöst und mit 400 ccm Alkohol gefällt. Das erhaltene weiße Produkt zentrifugierte man ab. Filtration ist ungünstig, da das Produkt an der Luft zerfließt. Auf der Zentrifuge wurde zweimal mit Alkohol gewaschen und nochmals in vorher angegebener Weise gefällt. Wiederum zentrifugieren. Man erhielt ein feines weißes Pulver, das kein Halogen, aber viel Mg enthielt. Ausbeute 0,69 g (53% d. Th.). In mehreren Ansätzen fielen stets Mg-haltige Präparate an. Es ist mithin nach der Vorschrift von WHITE nicht möglich, reines l-Cystinyl-diglycin darzustellen.

Der Reinheitsgrad der Präparate wurde durch S- und N-Bestimmungen festgelegt. Für ein Präparat führte man ferner eine Mg-Bestimmung durch.

1. Präparat:

Analyse[35]: 0,0475 g Substanz: 0,0441 g $BaSO_4$ (= 0,0062 g Asche = 13,4% der Einwage) — 0,00626 g Substanz: 4,74 ccm 0,01 n-HCl (Mikro-Kjeldahl).

2. Präparat:

Analyse: 0,0542 g Substanz: 0,0598 g $BaSO_4$ (= 0,0057 g Asche = 10,5% der Einwage).

3. Präparat:

Analyse: 0,0375 g Substanz: 0,0310 g $BaSO_4$ (= 0,0069 g Asche = 18,4% der Einwage); 0,0150 g $Mg_2P_2O_7$ — 0,00548 g Substanz: 4,02 ccm 0,01 n-HCl (Mikro-Kjeldahl).

$C_{10}H_{18}O_6N_4S_2$ (354,3) Ber. S 18,09% Gef. S 12,75% (70,5% d. Th.)
10,61% (67,1% d. Th.)
15,18% (83,9% d. Th.)
N 15,82% N 11,35% (62,8% d. Th.)
10,30% (65,0% d. Th.)

Die Mg-Bestimmung wurde beim 3. Präparat in der nach der S-Bestimmung zurückgebliebenen Asche in üblicher Weise vorgenommen. 0,0069 g bezw. 0,0072 g Asche ergaben so 0,0150 g bezw. 0,0161 g $Mg_2P_2O_7$. Das entspricht 47,8% bezw. 48,6% Mg.

15. SH- und SS-Glutathion (XVII und XVI).

Es waren Präparate der Firma *Hoffmann-La Roche*, Berlin, die mehrfach bereits durchanalysiert waren.

---

[35]) Das 1. Präparat wurde zu den Spaltungen, das 2. Präparat zu den SS-Bestimmungen benutzt. Es wurde entsprechend mehr eingewogen.

II. Schwefelbestimmungen[36].

Im Anschluß an eine Arbeit von LEFÈVRE und M. RANGIER[37] machte ich den Versuch, nach der dort angegebenen Art Schwefelbestimmungen durchzuführen. Als Beispiel diente Dithio-diglykolsäure. Die Säure wurde in 50 ccm Wasser gelöst und 20 ccm 2n-NaOH zugefügt. Nach Zugabe von 25 ccm 4proz. $KMnO_4$-Lösung ließ man in der Kälte ½ Stunde stehen (Versuch 1 und 2). Dann wurde unter Rückfluß eine weitere Stunde gekocht, wobei man alle 5 Minuten kleine Mengen $KMnO_4$-Lösung zufügte, bis die rote Farbe bestehen blieb. Bei weiteren Versuchen (3 und 4) wurde die Disulfidlösung sofort zum Kochen erhitzt und die Permanganatlösung von Anfang an tropfenweise zugesetzt. Bei allen Versuchen wurde dann mit 2n-HCl angesäuert, durch längeres Kochen entfärbt und das überschüssige Chlor weggekocht. Anschließend erfolgte Fällung mit $BaCl_2$.

Versuch-Nr.	*Einwage in g*	*$BaSO_4$ in g*	*% vom Gesamtschwefel gef.*
1	0,2055	0,1783	34,8
2	0,2692	0,1831	26,5
3	0,2356	0,4764	79,2
4	0,2457	0,5170	82,1

Tab. 4

Aus diesen Daten ist zu ersehen, daß man nach den Angaben von LEFÈVRE und RANGIER vollkommen falsche Werte bekommt. Ist das Oxydationsmittel von Anfang an im Überschuß vorhanden, erzielt man bei mäßiger Alkalikonzentration nur eine geringe Durchoxydation. Tropft man hingegen das Permanganat in die heiße alkalische Disulfidlösung, so kann die SS-Bindung erst hydrolytisch aufgespalten werden. Die Oxydation erfolgt dann sekundär an dem entstandenen H_2S. Man erhält so eine wesentlich höhere H_2SO_4-Ausbeute. Im ersteren Fall dürfte ein Teil des Disulfides zur Sulfonsäure oxydiert werden. Sulfonsäuren sind aber gegenüber Oxydationsmitteln mitunter recht stabil. Wegen der langen Dauer der Bestimmungen ist die vorliegende Methode für analytische Zwecke *ungeeignet*.

Einige Schwefelbestimmungen zu der vorliegenden Arbeit waren nasse Veraschungen nach H. WAELSCH und G. KLEPETAR[38]. Das Veraschungsgemisch bestand aus Kupfernitrat, Ammoniumnitrat, Natriumchlorid und Soda. 15 ccm der $Cu(NO_3)_2$-Lösung (in 100 ccm H_2O sind 25 g $Cu(NO_3)_2$, 10 g NH_4NO_3 und 25 g NaCl) wurden mit 3 ccm konz. Sodalösung gut durchgeschüttelt und mit der zu analysierenden Substanz im Porzellantiegel auf einem Sandbad bei 150° zur Trockne eingeengt. Nach Aufnahme in 2n-HCl wurde wie üblich heiß mit $BaCl_2$ gefällt.

[36]) A. SCHÖBERL, Angew. Chem. 50, 334 (1937).
[37]) J. Pharmac. Chim. 21, 151 (1935); Chem. Ztrbl. 1935, II 561.
[38]) Ztschr. physiol. Chem. 211, 47 (1932).

So wurde die allerdings unreine β-Phthalimido-dithio-dilactylsäure (ber. 12,8% S) analysiert. Es wurde im Mittel 15,69% S gefunden (siehe früher). Die Verbrennung im Quarzrohr nach der von A. SCHÖBERL[39] ergänzten Methode von W. GROTE und H. KREKELER lieferte in guter Übereinstimmung damit im Mittel 15,42 S.

Diese nasse Veraschung konnte auch bei der alkalischen Spaltung von Cystin zur Bestimmung des Restschwefels in den Spaltansätzen benutzt werden. Nach der colorimetrischen Bestimmung sollten hierbei, wie später ausgeführt wird, noch 65,0% des Gesamtschwefels vorhanden sein. Die Veraschung (jeweils durchgeführt mit 20 ccm der Spaltlösungen) ergab im Mittel 72,0% S.

Bei Diformyl-cystin wurden weniger günstige Resultate in der Erfassung des Restschwefels bei den Spaltungen erhalten. Es lag das daran, daß man zunächst die sauren Lösungen weitgehend einengte und dann erst veraschte. Dabei traten beträchtliche Verluste auf. Man hätte vor dem Einengen erst alkalisch machen sollen.

Ganz allgemein ist bei der nassen Veraschung von SH-Verbindungen und Disulfiden, was mitunter nicht zu umgehen ist, *alkalisches Milieu* zu fordern. Richtige Werte bei *sauren* Veraschungen können Zufallswerte sein.

Die S-Analysen von Cystin und seinen Derivaten wurden mit bestem Erfolg durch Verbrennung im Quarzrohr ausgeführt. Die meisten Bestimmungen waren Halbmikroanalysen in der Mikroapparatur mit verkleinertem Absorptionsgefäß. Aber auch bei Mikroanalysen wurden in der von SCHÖBERL *und Mitarbeitern* beschriebenen Mikroapparatur richtige Ergebnisse erzielt. Nachdem alles SO_3 vom vorgelegten H_2O_2 absorbiert war, wurde nach Ansäuern mit HCl heiß mit $BaCl_2$ gefällt. Wird die Benzidinmethode[40] benutzt, so muß auf ein kleines Volumen eingeengt und kalt gefällt werden. Es ist unbedingt darauf zu achten, daß beim abwechselnden, tropfenweisen Nachwaschen auf dem Glasfilter mit Wasser und Methanol, zuerst mit Wasser gewaschen wird.

III. Colorimetrische Bestimmungen an Disulfiden und Sulfhydrylverbindungen.

Die Messungen wurden mit dem Pulfrich'schen-Stufenphotometer der Firma Zeiß ausgeführt, wobei nach der Substitutionsmethode gearbeitet wurde. Die Substratlösungen wurden in Küvetten gefüllt und in demselben Strahlengang wie deren Blindwerte gemessen. Die Schichtdicke der Küvetten richtete sich nach der jeweiligen Farbintensität. Am Photometer kann man die Extinktionen ablesen. Zur Ermittlung der für die Messung geeigneten Wellenlänge wurde an Hand von Absorptionskur-

[39]) A. SCHÖBERL, R. JARCZYNSKI, P. RAMBACHER, Angew. Chem. 50, 334 (1937).
[40]) 5 g Benzidin in 40 ccm n-HCl lösen und mit H_2O auf 250 ccm auffüllen.

ven[41]) festgestellt, daß bei Benutzung von Phosphorwolframsäure das Rotfilter S 72 für die Colorimetrie am günstigsten ist und gute Ergebnisse auch mit Gelbfilter S 57 erzielt werden. Bei der roten Farbe, die mit Nitroprussidnatrium entsteht, ist am besten Grünfilter S 53.

Bestimmungen mit 9 (18)-Wolframsäure-Phosphorsäure.

Diese Säure als Folin-Reagens bezeichnet, wird nach O. FOLIN[42]) aus molybdänfreiem[43]) Natriumwolframat und Phosphorsäure hergestellt.

Die Brauchbarkeit der Säure zur quantitativen colorimetrischen Bestimmung von Cystin und Cystein wurde von O. FOLIN festgestellt. Die Heteropolysäure wird von Sulfhydrylverbindungen zu einer intensiv blauen, noch komplexen Säure nach folgender Gleichung reduziert:

$$(1) \qquad 2\ RSH + (H_2O)_3 \cdot P_2O_5 \cdot (WO_3)_{18} \rightarrow RSSR + H_2O + (H_2O)_3 \cdot P_2O_5 \cdot (WO_3)_{17} \cdot WO_2$$

Das Folin-Reagens verschiebt als starkes Oxydationsmittel das Gleichgewicht der Reaktion ganz nach rechts, wobei man zur schnelleren Oxydation und Konstanz der Farbintensität abpuffert. Zur Bestimmung der Disulfide muß zuerst mit einem sehr großen Überschuß von Natriumsulfit die SS-Bindung aufgespalten werden.

$$(2) \qquad RSSR + H_2SO_3 \rightarrow RSH + RSSO_3H$$

Das Sulfit muß zur Erzielung richtiger Werte eine gewisse Zeit auf das Disulfid einwirken. Dann erfolgt nach Gleichung 1 die Oxydation durch das Folin-Reagens.

Die Bestimmung von SH-Verbindungen mit Folin-Reagens und Sulfit bringt gegenüber der Abwesenheit von Sulfit eine Farbverdoppelung, was in den Gleichungen 1 und 2 begründet ist, die ineinander greifen. Zunächst wird nach Gleichung 1 die SH-Verbindung zum Disulfid oxydiert. Dieses Disulfid wird nun vom Sulfit wiederum in die Sulfhydrylverbindung übergeführt, wie Gleichung 2 zeigt. Das so sekundär entstandene Sulfhydryl verfällt sogleich der Oxydation nach Gleichung 1 und diese Reaktionsfolge geht solange weiter, bis kein Sulfhydryl mehr vorhanden und alles in den Thioschwefelsäureester (Gleichung 2) übergeführt ist. Ein Mol Sulfhydrylverbindung mit Sulfit erzielt dann die gleiche Farbintensität wie ein Mol Disulfid, während also ein Mol Sulfhydryl ohne Sulfit den halben Wert liefert.

Zunächst wurden 0,01 m Substratlösungen von Cystin, Cysteinchlorhydrat und Diformyl-cystin in 0,2n-H_2SO_4 benutzt. Zusammensetzung der Ansätze (Versuche 1—5 in Tabelle 5):

---

[41]) A. SCHÖBERL, B. 70, 1186 (1937); A. SCHÖBERL, E. LUDWIG, B. 70, 1422 (1937); vergl. O. FOLIN, A. D. MARENZI, Journ. biol. Chem. 83, 103 (1929); K. SHINOHARA, Journ. biol. Chem. 112, 709 (1936).

[42]) Journ. biol. Chem. 106, 311 (1934).

[43]) O. FOLIN, H. TRIMBLE, 60, 473 (1934).

Versuch-Nr.	*Substrat mg*	*s*[44])	*Ee*	*Ea*	*E*	*Ek*	*b*	*Ek*$_b$
1. Cystin	2,40	1	0,0	0,87	0,87	0,87	0,03	0,84
2. Cystein	1,21	1	0,0	0,87	0,87	0,87	0,03	0,84
3. Cystein	1,21	1	0,4	0,83	0,43	0,43	0,01	0,42
4. Diformylcystin	2,96	3	1,0	1,15	0,15	0,05	0,03	0,02
5. Diformylcystin	2,96	1	1,0	1,23	0,23	0,23	0,03	0,20

Tab. 5

13 ccm 2 m-Acetatpuffer (p_H 5,2)[45]) + 1 ccm Substratlösung + 1 ccm 20proz. Natriumsulfit[46]) + 4 ccm Folin-Reagens, in einem Meßkolben sofort auf 50 ccm auffüllen und nach 15 Minuten mit dem Gelbfilter S 57 (Filterschwerpunkt bei 172 mμ) photometrieren. Ansatz 3 ohne Sulfit, Ansatz 5 nach 24 Stunden gemessen.

Die Versuche 1—3 zeigen, daß gleichmolare Cystin- und Cysteinkonzentrationen die gleiche Farbintensität liefern und daß bei Cystein Sulfit die Farbstärke *verdoppelt*. Diformyl-cystin ist unter den hier gewählten Versuchsbedingungen nicht wie Cystin bestimmbar (Versuche 4 und 5), wenn auch im Laufe der Zeit eine Farbvertiefung eintritt. Sulfit allein gibt mit Folin-Reagens ebenfalls eine, wenn auch hier schwache Blaufärbung. Dieser Blindwert ist bei den Messungen berücksichtigt worden.

Die Art der Einwirkung von Sulfit auf Cystin bringt es mit sich, daß man Cystin und Cystein *nebeneinander* bestimmen kann. Zur Prüfung wurde deshalb eine Lösung vermessen, die 1,8 mg Cystin und 0,91 mg Cystein enthielt. Ansatz einmal *mit*, das andere Mal *ohne* Sulfit in oben beschriebener Weise (Filter S 57 und s = 1):

Ek_b mit Sulfit = 1,27; Ek_b ohne Sulfit = 0,32.

Wenn man den *doppelten* Wert des ohne Sulfit ermittelten Ek von dem mit Sulfit gefundenen Ek abzieht, erhält man den für Cystin allein maßgebenden Ek. Es ergibt sich also:

Ek (Cystin) = 1,27 − 2 · 0,32 = 1,27 − 0,64 = 0,63. Mithin ist an Cystin vorhanden[47]: 2,40 : 0,84 = x : 0,63; x = 1,8 mg (Einwage 1,8 mg). An Cystein vorhanden: 1,21 : 0,42 = x : 0,32; x = 0,92 mg (Einwage 0,91 mg).

Es wurde nun der Versuch zur Reduktion von Diformyl-cystin in alkalischer Lösung durch Natriumsulfit gemacht. Dazu stellte man eine 0,00125 molare Diformyl-cystin-Lösung (0,3704 g in 10 ccm n-NaOH) und eine 0,005 molare Natriumsulfit-Lösung (1,26 g $Na_2SO_3 \cdot 7H_2O$ in 10 ccm H_2O) her und gab beide Lösungen zusammen. (Die Lösungen waren vorher mit N_2 durchgespült.) Die Lösung blieb nun bei Zimmer-

[44]) s = Schichtdicke in cm; Ee = eingestellte Extinktion; Ea = abgelesene Extinktion; E = Ea − Ee; Ek = Extinktionskoeffizient; b = Blindwert; Ek_b = Ek − b.

[45]) Pufferlösung nach SHINOHARA vom p_H 5,2: 10 ccm 2 m-CH_3COONa + 3 ccm 2 m-CH_3COOH.

[46]) 4 g $Na_2SO_3 \cdot 7\ H_2O$ auf 10 ccm Wasser.

[47]) Die Zahlen der Tab. 5 werden zugrundegelegt.

temperatur stehen. Von Zeit zu Zeit pipettierte man 1 ccm ab, versetzte mit 3 ccm 2 n-HCl und verkochte 10 Minuten zur Entfernung des SO_2, füllte dann mit Wasser im Meßkolben auf 25 ccm auf. Von dieser Lösung wurden jeweils 5 ccm zu den colorimetrischen Bestimmungen verwandt. (Ansätze wie oben beschrieben.) Filter S 57; s = 1:

Mit Sulfit:

Reaktionsdauer in Stunden	*Ee*	*Ea*	*E*	*b*	Ek_b	*mg Diformyl-cystin in 20 ccm*
1¼	0,0	1,230	1,230	0,03	1,200	244
4	0,0	1,125	1,125	0,03	1,095	198
7½	0,0	1,081	1,081	0,03	1,051	173

Ohne Sulfit:

Reaktionsdauer in Stunden	*Ee*	*Ea*	*E*	*b*	Ek_b	*mg Formyl-cystein in 20 ccm*
1¼	0,6	0,862	0,264	0,01	0,254	90,1
4	0,3	0,577	0,277	0,01	0,267	94,7
7½	0,3	0,590	0,290	0,01	0,280	99,3

Tab. 6

Die Berechnungen von Diformyl-cystin und Formyl-cystein erfolgten unter Bezugnahme auf Tabelle 5 aus den Werten für Cystin bezw. Cystein bei Annahme der Gültigkeit des Beer'schen Gesetzes. Darnach entsprechen 2,96 mg Diformyl-cystin einem Ek von 0,84 und 1,49 mg Formyl-cystein einem Ek von 0,42. Vorausgesetzt ist hier prinzipiell gleiche Bestimmbarkeit wie bei Cystin-Cystein. Es ergibt sich, daß in alkalischer Lösung das Sulfit die SS-Bindung im Diformyl-cystin rasch öffnen kann. Es wird deshalb auch ohne Sulfitzusatz bei der colorimetrischen Bestimmung eine beachtliche Farbintensität gefunden als Zeichen für die Reduktion des Folin-Reagenses durch eine SH-Verbindung. Die bei den Diformyl-cystin-Bestimmungen erhaltenen Farbintensitäten sind wesentlich höher als man sie nach Tabelle 5 hätte erwarten können. Wesentlich ist aber, daß dort die Sulfiteinwirkung erst bei der colorimetrischen Bestimmung bei p_H 5,2 beginnen kann, während sie hier der Messung vorgeschaltet ist. Andererseits wird hier in der alkalischen Lösung der Formylrest langsam abgespalten, so daß man letzten Endes teilweise Cystin colorimetriert.

Diese Abspaltung des Formylrestes ist unter den gleichen Versuchsbedingungen aus der Zunahme der freien NH_2-Gruppen untersucht worden. Die Mikro-van Slyke-Bestimmungen wurden mit *0,5 ccm* der obigen Substratlösung durchgeführt (Tabelle 7).

Reaktionsdauer in Stunden	*t*	*Barometer mm*	*Blindwert ccm*	*ccm N_2 gef.*	*Cystin mg in 20 ccm*	*% d. Th.*
½	24	753	0,08	0,33	47,3	15,8
2¾	25	753	0,08	0,46	71,6	23,9
5	24	753	0,08	0,585	95,5	31,8
7¾	22,5	753	0,08	0,63	104,9	35,0
50	22	750	0,10	1,08	206,0	68,6

Tab. 7

Schließlich wurde eine Lösung von 0,3704 g Diformyl-cystin in 20 ccm 0,5 n-NaOH, aber ohne Sulfit in gleicher Weise untersucht. In den Bestimmungen verwandte man jeweils *1 ccm* Substrat (Tabelle 8).

Reaktionsdauer in Stunden	*t*	*Barometer mm*	*Blindwert ccm*	*ccm N_2 gef.*	*Cystin mg in 20 ccm*	*% d. Th.*
1½	22	750	0,105	0,285	17,2	5,7
5	22	750	0,105	0,580	45,3	15,0
8¼	22	750	0,105	1,110	95,8	31,9

Tab. 8

Aus den Tabellen 7 und 8 geht hervor, daß neben der Öffnung der SS-Bindung durch Sulfit in alkalischer Lösung auch eine Abspaltung des Formylrestes einhergeht. Auffällig dabei ist, daß ohne Sulfit weniger NH_2-Stickstoff auftritt (Tabelle 8). Vielleicht liegen gekoppelte Reaktionen vor.

An dem Beispiel des Diformyl-cystins ist zum ersten Mal der entscheidende Einfluß der Reaktionsdauer bei den colorimetrischen Bestimmungen zum Ausdruck gekommen. Sowohl die Oxydation der SH-Verbindung durch das Folin-Reagens, als auch die Disproportionierung der Disulfidbindung durch Sulfit sind Zeitreaktionen, von denen die zweite die langsamere ist. Unter Berücksichtigung dieses Gesichtspunktes wird deshalb bei den Messungen jetzt folgendermaßen verfahren:

1. *Ansatz mit Sulfit:* Substratlösung + 13 ccm 2 m-Acetatpuffer vom p_H 5,2 + 2 ccm 20proz. Natriumsulfitlösung. 10 Minuten warten. Nun 4 ccm Folin-Reagens zufügen und nochmals 30 Minuten warten. Schließlich auf 50 ccm mit Wasser auffüllen.
2. *Ansatz ohne Sulfit:* Substratlösung + 13 ccm 2 m-Acetatpuffer vom p_H 5,2 + 4 ccm Folin-Reagens. 30 Minuten warten, dann auf 50 ccm mit Wasser auffüllen.

A. Schöberl und E. Ludwig[48]) haben bei Cystin für einen größeren Konzentrationsbereich mit den Filtern S 72 (Rotfilter) und S 57 (Gelbfilter) die Farbintensitäten vermessen (Figur 1). In der gleichen Weise wurde nun eine 0,01 m-Cystein-chlorhydrat-Lösung in 0,2 n-H_2SO_4 *ohne* Sulfit vermessen (Tabelle 9 und Figur 2). t[49]) = 20°:

[48]) B. 70, 1422 (1937); siehe dort Tab. 4 und Fig. 1.

[49]) Über den wichtigen Einfluß der Temperatur bei den vorliegenden photo-

mg Cystein in 50 ccm	0,182	0,303	0,605	0,908	1,21
Mol. Konzentration	$3 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1{,}5 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$
Ek für Filter S 72[50])	0,08	0,17	0,36	0,58	0,78
Ek für Filter S 57	0,03	0,07	0,17	0,28	0,38
mg Cystein in 50 ccm	1,815	2,42	3,025	3,63	
Mol. Konzentration	$3 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$6 \cdot 10^{-4}$	
Ek für Filter S 72	1,26	1,64	2,12	2,54	
Ek für Filter S 57	0,66	0,84	1,08	1,34	

Tab. 9

Figur 2 enthält die mit Cystein ermittelten Farbintensitäten. Auf der Ordinate wurden die Extinktionskoeffizienten, auf der Abszisse die mg Cystein in 50 ccm aufgetragen. Die Punkte liegen auf einer Geraden. Diese müßte bei strenger Gültigkeit des Beer'schen Gesetzes durch den Nullpunkt verlaufen. Die geringen Abweichungen sind wohl in erster Linie auf die leichte Oxydierbarkeit von Cystein durch den Luftsauerstoff zurückzuführen. Praktisch wird sich das nie ganz vermeiden lassen, wenn man die ganze Bestimmung nicht zu sehr komplizieren will. Figur 1 ist der erwähnten Arbeit von A. SCHÖBERL und E. LUDWIG entnommen. Diese Eichkurven in den Figuren 1 und 2 dienen zur Ermittlung *unbekannter* Substratkonzentrationen. Gewöhnlich ist mit dem Rotfilter S 72 gearbeitet worden.

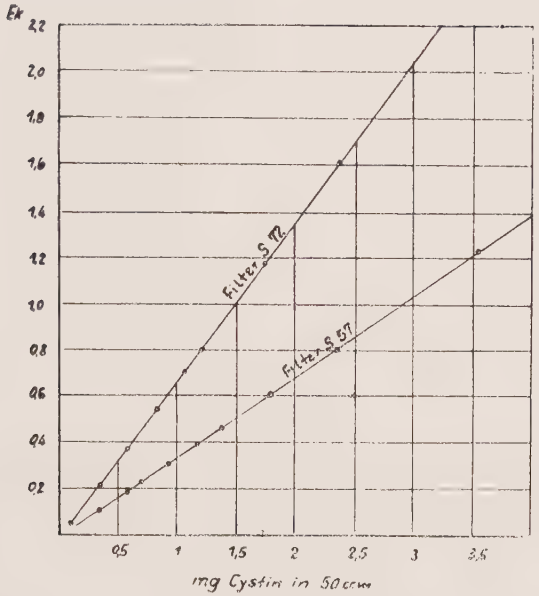
Auf Grund der Erfahrungen am Diformyl-cystin mußte experimentell festgestellt werden, ob sich die in vorliegender Arbeit untersuchten Cystinderivate in gleicher Weise wie Cystin selbst mit 9(18)-Wolframsäure-Phosphorsäure colorimetrisch bestimmen lassen. Entscheidend war hierbei in erster Linie die Frage der Geschwindigkeit der Aufspaltung der SS-Bindung durch Sulfit. Es war dies auch wegen der Wertung der später beschriebenen Spaltungsversuche nötig. Von den in der folgenden Tabelle verzeichneten Disulfiden gelangten 0,01 m-Lösungen zur Verwendung. (Bei 20,0° im Thermostaten hergestellt[51]).) Davon benutzte man jeweils 1 ccm. Ansätze mit Sulfit wie oben beschrieben; sie befanden sich während der Reaktionszeit in einem Thermostaten von 20,0°. Doppelbestimmungen. Ergebnisse in Tabelle 10 (Filter S 72, s = 0,5).

---

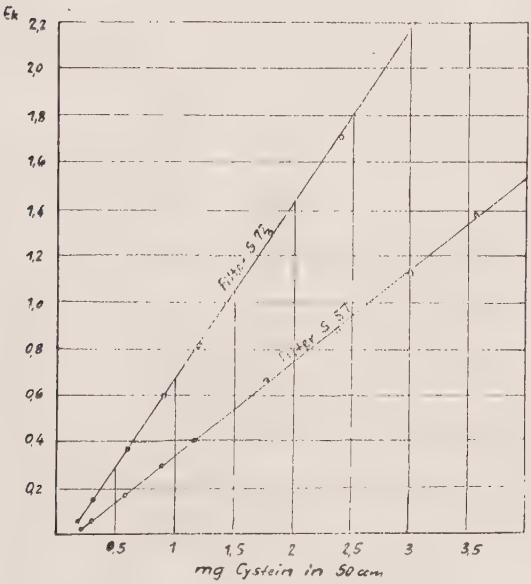
metrischen Bestimmungen vergl. eine gleichzeitig erscheinende Mitteilung von A. SCHÖBERL.

[50]) Ek_b bei Filter S 72 ist gerade ungefähr doppelt so groß wie bei Filter S 57.

[51]) Um 0,01 m-Lösungen zu erhalten, wurde die entsprechende Menge Disulfid erst in 1 ccm ges. $NaHCO_3$-Lösung gelöst und auf 10 ccm im Meßkölbchen bei 20,0° aufgefüllt. Benzoyl-cystin mußte in 2 ccm n-NaOH gelöst werden. Cystinhydantoin kann nicht gemessen werden, da es sich in $NaHCO_3$ nicht löst, in NaOH aber sofort zersetzt wird.



Figur 1



Figur 2

Substrat	*mg Disulfid pro Ansatz (in 50 ccm)*	*Ee*	*Ea*		*E*	*Ek*	*b*	Ek_b
Cystin	2,40	0,0	0,86	/	0,860	1,72	0,14	1,58
Dibenzoyl-cystin	4,48	0,2	1,04	1,06	0,850	1,70	0,14	1,56
Dibrompropionyl-cystin	5,10	0,2	0,95	0,96	0,755	1,51	0,14	1,37
Dialanyl-cystin	3,82	0,2	0,96	0,95	0,755	1,51	0,14	1,37
Diformyl-cystin	2,96	0,2	1,10	1,07	0,885	1,77	0,16	1,63
Dichloracetyl-cystin	3,94	0,2	0,96	0,99	0,775	1,55	0,14	1,39[52])
Diglycyl-cystin	3,54	0,2	1,04	1,05	0,845	1,69	0,14	1,55
Dicarbobenzoxy-cystin	5,08	0,2	1,09	1,07	0,880	1,76	0,14	1,62
Dicarbobenzoxy-cystinyl-diglycin	6,22	0,2	1,07	1,10	0,885	1,77	0,14	1,63
Cystinyl-diglycin	3,54	0,0	0,85	0,88	0,865	1,73	0,16	1,57

Tab. 10

Es ist also zu erkennen, daß man die meisten Cystinderivate ohne weiteres nach dieser Methode bestimmen kann. Eine zu geringe Farbstärke zeigen Dibrompropionyl-, Dialanyl- und Dichloracetyl-cystin.

Besonders das Diformyl-cystin, das jetzt einen Ek 1,63, früher aber nur Ek 0,02 lieferte, läßt erkennen, wie wichtig eine genügend lange Einwirkung von Natriumsulfit und Folin-Reagens ist. Bei der jetzt befolgten Bestimmungsmethode scheint diese grundsätzliche Forderung erfüllt zu sein. Wie der entsprechende Versuch am Dichloracetyl-cystin zeigt, dürften bei den aus der Reihe fallenden Beispielen mit zu geringer Farbintensität diese Einwirkungszeiten noch nicht genügen.

Bestimmungen mit Nitroprussidnatrium.

SH-Verbindungen geben mit Nitroprussidnatrium in alkalischer Lösung intensive rote Färbungen. Die Farbe, die gegen Licht- und Sauerstoffeinwirkung sehr empfindlich ist, kann durch KCN-Zusatz stabilisiert werden. Ebenso hat sich die Verwendung eines Glykokollpulvers vom p_H etwa 10,4 als sehr vorteilhaft erwiesen. Da KCN Disulfide nach der Gleichung:

$$RSSR + HCN \rightarrow RSH + RSCN$$

aufspaltet, können auch sie so colorimetrisch bestimmt werden. Die Grundlage dieser Methode wird ausführlich bei A. SCHÖBERL und E. LUDWIG behandelt[53]). Wichtig ist, daß gleichmolare Cystein- und Cystinkonzentrationen die gleiche Farbintensität liefern.

---

[52]) Wartete man beim Ansatz der Reaktionslösung 5 Stunden (statt 30 Minuten) nach der Zugabe von Folin-Reagens, so wird $Ek_b = 1{,}58$.

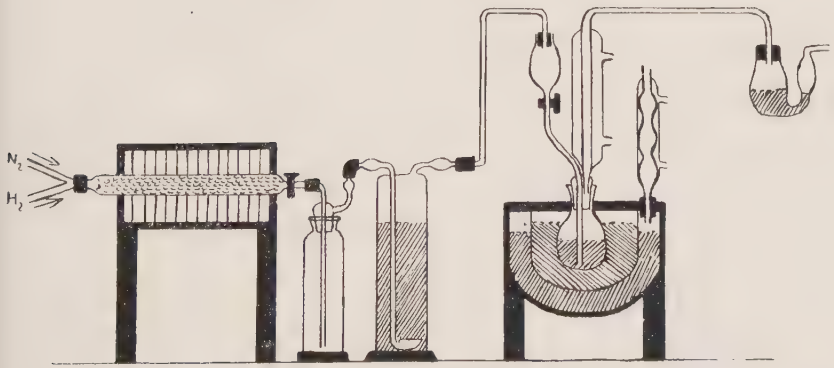
[53]) B. 70, 1122 (1937); vergl. W. GRASSMANN, E. HANSCHKE, Dissertation München 1932.

Die Ansätze zur Messung setzten sich wie bei A. SCHÖBERL und E. LUDWIG zusammen aus: 1 ccm einer 0,01 m-Cystein-chlorhydrat-Lösung in 0,2 n-H_2SO_4 (= 1,21 mg Cystein) + 5 ccm Glykokollpuffer[54] vom p_H 10,4 + 1 ccm m-KCN-Lösung[55] in Glykokollpuffer + 2 ccm 0,2 m-Nitroprussidnatrium-Lösung[56]. Auf 50 ccm mit Wasser auffüllen und sofort messen. Zur Aufnahme der Absorptionskurve wurden alle Filter des Pulfrich-Photometers durchgemessen und festgestellt, daß für die rote Farbreaktion Grünfilter S 53 am besten geeignet ist, obwohl die beiden Hälften des Photometergesichtsfeldes in der Farbe nie genau den gleichen Farbton haben. Die Farbintensität nimmt rasch ab und nur bei sofortiger Messung werden brauchbare Werte erzielt. Bei Bestimmung von Cystin ist deutlich die Zeitabhängigkeit der Reduktion durch KCN zu sehen. Nach ½ Stunde war noch nicht durchreduziert, erst nach 1 Stunde bekommt man vernünftige Werte. Ebenso ging es beim Diformyl-cystin, bei dem nach einstündiger KCN-Einwirkung 45% SH-Verbindung erfaßt wurden.

Auf ein näheres Eingehen auf die Bestimmungen mit Nitroprussidnatrium wird verzichtet, da diese Methode wegen etlicher Fehlermöglichkeiten, die A. SCHÖBERL und E. LUDWIG inzwischen mitgeteilt haben, keine Verwendung in der vorliegenden Arbeit gefunden hat. Es wurde ausschließlich die weit zuverlässigere Methode von FOLIN-MARENZI benutzt.

IV. Die Spaltung der Disulfide durch Alkali.

1. Die Versuchsanordnung.



Die Versuche wurden in einem Thermostaten durchgeführt, dessen Temperatur durch ein siedendes Wasserbad um 99° gehalten wurde. Die

[54]) 55 ccm m-Glykokoll (aus 7,505 g Glykokoll + 5,85 g NaCl in 100 ccm Wasser) + 45 ccm n-NaOH.

[55]) 650 mg in 10 ccm Glykokollpuffer.

[56]) 0,6 g $[Fe(CN)_5NO]Na_2 \cdot 2H_2O$ in 10 ccm Wasser. Stets frisch herstellen!

gesamte Versuchsanordnung zeigt Fig. 3. Zu den Spaltungen benutzte man eine Schliffapparatur. Um Wärmeverluste zu vermeiden, war der Thermostat mit einer Bleiplatte abgedeckt. Durch den Tropftrichter der Apparatur konnte ein völlig sauerstofffreies N_2-H_2-Gemisch eingeleitet werden. Die Reinigung der Gase erfolgte durch Leiten über eine Schicht glühenden Kupfers. Die letzten Spuren von Sauerstoff entfernte man durch eine große Waschflasche mit Glasfritte, die $CrCl_2$ enthielt. NH_3 und H_2S wurden durch Volhard'sche Vorlagen, die mit Salzsäure bezw. Cadmiumacetatlösung gefüllt waren, absorbiert.

2. Die Ausführung der Spaltungen.

In der eben beschriebenen Spaltungsapparatur wurden in den meisten Fällen die Versuche mit 0,02 m-Disulfidlösungen (d. s. 0,0005 Mole in 25 ccm) durchgeführt. Die zu untersuchende Substanz wurde genau in den 100 ccm-Kolben eingewogen. Dann setzte man den Kolben nach Aufsetzen des Schliffkühlers bis zum Halse in den inzwischen angeheizten Thermostaten. Nun verdrängte man die Luft in der Apparatur völlig durch das N_2-H_2-Gemisch. Inzwischen hatte man auch die Volhard'sche Vorlage mit meist 10—15 ccm 0,1 n-HCl angeschlossen. Schließlich wurde durch den Tropftrichter NaOH bestimmter Konzentration unter stetem Schütteln in den Reaktionskolben eingedrückt. Unter langsamem Durchleiten von N_2 und H_2 erhitzte man meist 2 Stunden lang.

Nach dieser Zeit wurde die Vorlage für die NH_3-Absorption entfernt und in ihr durch Rücktitration mit 0,1 n-NaOH das abgespaltene Ammoniak bestimmt[57]. Die Vorlage ersetzte man sofort durch eine andere, die diesmal mit ungefähr 20 ccm Cadmiumacetatlösung beschickt war[58]. Die alkalische Reaktionslösung wurde ferner durch den Tropftrichter mit 20 ccm 6 n-HCl angesäuert.

Der nun freiwerdende Schwefelwasserstoff wurde im Verlaufe von 1 Stunde völlig übergetrieben und als Cadmiumsulfid erfaßt. Während dieser Zeit blieb das Reaktionsgefäß im Thermostaten und wurde mit N_2-H_2 durchgespült. Das CdS titrierte man dann direkt in der Vorlage durch Zugabe von 0,1 n-J oder 0,1 n-KJO_3 und Rücktitration mit 0,1 n-$Na_2S_2O_3$ in üblicher Weise.

Nach dieser Zeit (meist also nach 3 Stunden) war der Versuch beendet. Die Apparatur kam aus dem Thermostaten und man ließ erkalten. Anschließend spülte man quantitativ aus dem Zersetzungskolben und füllte im Meßkolben mit Wasser auf 100 ccm auf (= Lösung A). War elementarer Schwefel entstanden, so wurde dieser abfiltriert und möglichst quantitativ durch Auswägen bestimmt.

---

[57]) Als Indicator diente der Mischindicator nach B. Groak, Biochem. Ztschr. 244, 294 (1932). Mit dem Indicator, der sauer violett und alkalisch grün reagiert, wird in der Hitze auf farblos titriert.

[58]) 10 g Cadmiumcarbonat in 10 ccm Eisessig heiß lösen und mit Wasser auf 500 ccm auffüllen.

10—20 ccm von Lösung A dienten zur direkten jodometrischen Titration der entstandenen SH-Verbindung mit 0,1 n-J oder KJO_3.[59]).

In einem anderen Teil von Lösung A — meist 4 ccm — wurde der Amino-Stickstoff mittels einer Mikro-van Slyke-Apparatur ermittelt[60]). Freie NH_2-Gruppen waren zum Teil in den Substanzen bereits vorhanden, teilweise konnten sie aber auch erst durch Hydrolyse in dem alkalischen Reaktionsmilieu entstehen.

Weitere 5 ccm von Lösung A brauchte man zur Ermittlung des noch vorhandenen Gesamtstickstoffes nach Mikro-Kjeldahl[24]). Die Veraschung erfolgt mit 1 ccm selenhaltiger konz. H_2SO_4. Man spülte quantitativ in die NH_3-Bestimmungsapparatur, versetzte mit 7 ccm 30proz. NaOH und destillierte in üblicher Weise. Zur Absorption des übergehenden Ammoniaks wurden 5 ccm 0,02 n-HCl vorgelegt. Zurücktitriert wurde mit 0,01 n-NaOH.

Wieder ein anderer Teil von Lösung A — häufig 4 ccm — fand Verwendung zur colorimetrischen Bestimmung von entstandener SH-Verbindung und noch vorhandenem Disulfid mit Hilfe des Pulfrich-Photometers. Die Ansätze hierzu zeigten folgende Zusammensetzung:
Bestimmung von SH-Verbindung: Substratlösung + 13 ccm 2 m-Acetatpuffer vom p_H 5,2 + 4 ccm Folin-Reagens. Nach 30 Minuten wird im Meßkolben auf 50 ccm mit Wasser aufgefüllt und in Küvetten gemessen. *Bestimmung von SH-Verbindung und Disulfid:* Substratlösung + 13 ccm 2 m-Acetatpuffer + 2 ccm 20proz. Na_2SO_3-Lösung. Nach 10 Minuten + 4 ccm Folin-Reagens. Nach weiteren 30 Minuten wird im Meßkolben auf 50 ccm mit Wasser aufgefüllt und gemessen.

Die Auswertung der gefundenen Farbintensitäten ist an Hand der früher mitgeteilten Eichkurven vorzunehmen. Zur Berechnung von vorhandenem Disulfid muß zunächst die der SH-Verbindung zukommende Farbintensität abgezogen werden. Das Prinzip dieser Berechnung ist ebenfalls auf S. 41 bei der gleichzeitigen Bestimmung von Cystin und Cystein nebeneinander dargelegt worden.

3. Der quantitative Verlauf der Spaltungen.

1) Spaltung von l-Cystin.

Substratkonz. = 0,04 m (0,2403 g in 25 ccm): Zersetzungszeit 2 Stunden; t = 99°; 12 Mole NaOH pro Mol Cystin (12 ccm n-NaOH).
NH_3: 3,20 ccm 0,1 n-HCl = 5,45 mg. — *H_2S:* 3,157; 3,509 ccm 0,1-n-J = 5,37; 5,97 mg. — *NH_2-N:* 2 ccm Substratlösung (= Lösung A

[59]) Stärke als Indicator. Es gibt keinen scharfen Umschlag.

[60]) Cystin und seine Derivate geben zu hohe Werte (107%). Deshalb muß auf 100% umgerechnet werden. Bei einem Teil der Versuche wurde zum Eisessig KJ (2%) gegeben, was richtige Werte liefert (100%). A. B. KENDRICK, M. E. HANKE, Journ. biol. Chem. 107, 161 (1937).

von S. 48): 0,95 ccm N_2[61]) 100 ccm Substratlösung: (192,7)[62]) 180 mg Cystin (26°, 750 mm, 0,125 ccm)[63]). — *SH (jodometr.):* 10 ccm Substratlösung: 0,96; 0,96; 0,887; 0,918 ccm 0,1 n-J; 100 ccm Substratlösung: 116,0; 116,0; 107,4; 111,2 mg Cystein[64]). — *Restschwefel* in Lösung A: 100 ccm Substratlösung: 332,0; 340,5 mg $BaSO_4$. — *SH und SS (colorimetr.):* Filter S 57; s = 1; b[65]) = 0,03 und 0,01; 1 ccm Substratlösung:

	Ek[66])			Ek_b			Ek_b im Mittel
SH + SS	0,75	0,93	0,93	0,72	0,90	0,90	0,84
SH	0,32	0,35	0,36	0,31	0,34	0,35	0,33

SH: Ek_b 0,33 = 1,01 mg; 100 ccm Substratlösung: 101 mg Cystein.
SS: Ek_b 0,18 = 0,57 mg; 100 ccm Substratlösung: 57,0 mg Cystin.

Zusammenstellung der Resultate:

NH_3			NH_2-N			H_2S		
mg		% N	mg Cystin		% N	mg		% S
ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
34,0	5,5	16,2	240,3	180,0	74,9	68,2	5,7	8,3

Rest-S in Lsg. A			SH (jodometr.)			SH (colorimetr.)			SS (colorimetr.)		
mg $BaSO_4$		% S	mg Cystein		% S	mg Cystein		% S	mg Cystin		% S
ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
467,0	336,3	72,0	242,2	112,7	46,5	242,2	101,0	41,7	240,3	57,0	23,8

Tab. 11.

Änderung von Zersetzungszeit und Alkalität.

Zunächst einige Vorbemerkungen. Da bei diesen ersten Versuchen ein Leitz-Colorimeter zur Messung des entstandenen Cysteins Verwendung fand, wurden zur Messung selbst eine Substratlösung und eine Vergleichslösung benötigt.

Substratlösung: 3 ccm der nach der Spaltung auf 100 ccm aufgefüllten Lösung + 20 ccm ges. $NaHCO_3$-Lösung + 8 ccm Folin-Reagens. Nach 8 Minuten auf 100 ccm mit Wasser auffüllen und messen.

Vergleichslösung: 1 ccm einer 0,01 Cystein-chlorhydrat-Lösung in 0,2n-H_2SO_4 + 20 ccm ges. $NaHCO_3$-Lösung + 8 ccm Folin-Reagens. Nach 8 Minuten auf 100 ccm mit Wasser auffüllen.

---

[61]) An der Bürette abgelesenes nicht umgerechnetes N_2-Volumen.

[62]) Da Cystin und seine Derivate bei Mikro-van-Slyke-Bestimmungen zu hohe Werte geben (107%), muß auf 100% umgerechnet werden. (Hier sind 192,7 mg = 107% und 180 mg = 100%).

[63]) Blindwert.

[64]) Auch bei den Derivaten des Cystins sind die jodometr. und colorimetr. SH-Werte auf Cystein, die colorimetr. SS-Werte auf Cystin bezogen.

[65]) Die erste Zahl ist Blindwert mit, die zweite Zahl ohne Sulfit.

[66]) Am Photometer werden meist Extinktionen zwischen 0,9 und 1,1 abgelesen. Bei zu geringer Farbintensität stellte man eine Extinktion ein.

Am Colorimeter wurde die Substratlösung auf eine bestimmte Schichthöhe eingestellt und dann mit der Vergleichslösung verglichen[67]).

Auch die Spaltansätze wurden anfangs etwas anders hergestellt. Man ging von einer 0,1 m-Cystin-Stammlösung (Na-Salz) aus, indem man Cystin in einem Meßkölbchen abwog, mit Wasser aufschlämmte, durch Zugabe von 10 ccm n-NaOH löste und dann auf 50 ccm auffüllte. Zur Spaltung benötigte man von dieser Lösung 10 ccm (= 0,2403 g Cystin). Das Gesamtvolumen war stets 25 ccm. An Alkali gab man bei den verschiedenen Ansätzen 4, 6 und 10 ccm n-NaOH zu. Pro Mol Cystin waren 6, 8 und 12 Mole NaOH vorhanden[68]).

Die folgende Tabelle enthält die Mittelwerte aus mindestens 2 Spaltungen. Sie gibt über den Einfluß der Änderung von Zersetzungzeit und Alkalikonzentration Aufschluß. Die H_2S-Ausbeuten sind fast durchweg etwas höher als bei der vorher beschriebenen Cystinspaltung. Ein Grund hierfür kann nicht angegeben werden. Die colorimetrischen Bestimmungen beanspruchen ebenfalls nicht die Genauigkeit der sonst üblichen photometrischen Messungen. Im Prinzip treten aber die Einflüsse von Zersetzungszeit und Alkalikonzentration doch zutage.

Mole NaOH	6	6	6	8	8	12
Zersetzungszeit (Std.)	1	2	4	1	2	2
NH_3:						
mg ber.	34,0	34,0	34,0	34,0	34,0	34,0
mg gef.	2,5	3,7	5,5	3,3	4,3	4,9
% N	7,5	10,8	15,9	9,5	12,5	14,3
H_2S:						
mg ber.	68,0	68,0	68,0	68,0	68,0	68,0
mg gef.	3,2	6,6	11,4	6,5	9,7	13,2
% S	4,7	9,7	16,7	9,4	14,3	19,3
SH (jodometr.):						
mg Cystein ber.	242,2	242,2	242,2	242,2	242,2	242,2
mg Cystein gef.	76,5	77,4	81,9	86,5	86,2	102,1
% S	31,6	31,9	33,8	35,7	35,4	42,1
SH (colorimetr.):						
mg Cystein ber.	242,2	242,2	242,2	242,2	242,2	242,2
mg Cystein gef.	53,9	56,4	76,3	46,6	62,4	75,3
% S	22,3	23,3	31,5	19,3	25,7	31,1

Tab. 12

Spaltung unter Zusatz von p-Hydrazinobenzoesäure[69]).

Ausgangsmaterial: 3,1 g (= 0,02 Mol) p-Hydrazinobenzoesäure, 8 g Bleiacetat[70]), 8 g NaOH in 200 ccm Wasser, 2,4 g (= 0,01 Mol) Cystin.

[67]) Berechnung erfolgt nach dem Beer'schen Gesetz.

[68]) 2 Mole NaOH sind schon bei der Herstellung der Cystinlösung zur Bildung des Na-salzes verbraucht worden.

[69]) H. T. Clarke, J. M. Inouye, Journ. biol. Chem. 89, 399 (1930).

[70]) Es ist das kristallwasserhaltige Salz gemeint.

Die Lösung wird im H_2-Strom unter Rückfluß 16 Stunden gekocht. Nach dem Erkalten filtriert man vom gebildeten Bleisulfid ab und versetzt das Filtrat mit 6 ccm Eisessig. Die dabei ausfallende Bleiverbindung filtriert man ebenfalls ab. Man macht nun das Filtrat mit 10 ccm konz. NH_3 alkalisch und dampft die Lösung zur Trockene ein. Der Rückstand wird mit NH_3 ausgekocht. Nach dem Filtrieren säuert man mit konz. HCl an. Der entstehende Niederschlag wird abgesaugt und getrocknet. Ausbeute an Brenztraubensäure-p-carboxyphenyl-hydrazon 2,45 g (55% d. Th.). F. des Rohproduktes 227°. Durch Umkristallisieren aus 95prozentigem Äthylalkohol erhöht sich F. auf 237°. Nochmaliges Umlösen aus Eisessig gibt F. 241°. Der Schmelzpunkt ist von der Art des Erhitzens abhängig. Heizt man den Berl-Block auf etwa 235° an, so läßt sich F. auf 243,5° erhöhen.

2) Einwirkung von Natronlauge auf l-Cystein.

Substratkonz. = 0,02 m (0,1756 g Cysteinchlorhydrat = 0,1211 g Cystein in 50 ccm); Zersetzungszeit 2 Stunden; t = 99°.
Versuche 1 und 2: 12 Mole NaOH pro Mol Cystein (13 ccm n-NaOH[71]).
Versuch 3: 24 Mole NaOH pro Mol Cystein (25 ccm n-NaOH[71]).
NH_3: 0,04; 0,00; 0,00 ccm 0,1 n-HCl = 0 mg. — *H_2S:* 0,35; 0,33; 0,35 ccm 0,1 n-KJO_3 = 0,60; 0,56; 0,60 mg. — *NH_2-N:* 4 ccm Substratlösung: 1,16 ccm N_2; 100 ccm Substratlösung: 121,0 mg Cystein[72] (22°, 741 mm, 0,14 ccm). — *N_2:*[73] 5 ccm Substratlösung: 5,28; 5,17 ccm 0,01 n-HCl; 100 ccm Substratlösung: 14,78; 14,47 mg N_2. — *SH (jodometr.):* 20 ccm Substratlösung: 1,95; 1,95; 1,95 ccm 0,1 n-KJO_3; 100 ccm Substratlösung: 118,0; 118,0; 118,0 mg. — *SH (colorimetr.):* Filter S 72; s (= 0,5; b = 0,027[74]); 4 ccm Substratlösung; E = 1,65; Ek_c = 3,30; Ek_b = 3,28 (Mittel aus drei völlig übereinstimmenden Messungen) = 4,76 mg Cystein; 100 ccm Substratlösung: 119,2 mg.

Die Erhöhung der Alkalität von 12 Mole auf 24 Mole NaOH ändert am Verlaufe der Spaltung nichts.

Zusammenstellung der Resultate:

NH_3			NH_2-N			N_2		
mg		% N	mg Cystein		% N	mg		% N
ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
17,0	0	0	121,1	121,0	100,0	14,0	14,6	104,4
H_2S			SH (jodometr.)			SH (colorimetr.)		
mg		% S	mg Cystein		% S	mg Cystein		% S
ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
34,0	0,58	1,7	121,1	118,0	97,5	121,1	119,2	98,5

Tab. 13

[71]) 1 ccm n-NaOH zur Neutralisation der HCl im Chlorhydrat.
[72]) Mikro-van Slyke mit KJ-Eisessig durchgeführt.
[73]) Mikro-Kjeldahl: 5 ccm Substratlösung mit 1 ccm Se-haltiger H_2SO_4 verascht.
[74]) Ohne Sulfit.

3) Spaltung von Dithio-dihydracrylsäure.

Substratkonz. = 0,02 m (0,2102 g in 50 ccm); Zersetzungszeit 2 Stunden; t = 99°.
12 Mole NaOH pro Mol Dithio-dihydracrylsäure (12 ccm n-NaOH).
H_2S: 2,52; 2,38 ccm 0,1 n-J = 4,27; 4,05 mg. — *SH (jodometr.):* 20 ccm Substratlösung: 0,36, 0,34 ccm 0,1 n-J; 100 ccm Substratlösung: 19,1; 18,0 mg Thiohydracrylsäure. — *SH (colorimetr.):* da mit Folin-Reagens nur geringe Blaufärbung, unterblieb die Bestimmung.
Zusammenstellung der Resultate:

H_2S			SH (jodometr.)			
mg		% S	mg Thiohydr.		% S	
ber.	gef.		ber.	gef.		*Tab. 14*
68,2	4,2	6,1	212,2	18,6	8,8	

4) Spaltung von l-Cystinhydantoin.

Substratkonz. = 0,008 m (0,05805 g in 25 ccm); Zersetzungszeit 1 Stunde; t = 99°.
12 Mole NaOH pro Mol Cystinhydantoin (2,4 ccm n-NaOH).
NH_3:[75]) 0,3; 0,4; 0,3 ccm 0,1 n-HCl = 0,51; 0,68; 0,51 mg. — *H_2S:* 4,30; 4,14; 4,22 ccm 0,1 n-J = 7,3; 7,0; 7,2 mg. — *SH (jodometr.):* 0,0 mg Cystein. — *Elem.-S.:* es wurden 1,161 g unter den obigen Bedingungen gespalten und 0,1318 g S gefunden.

Cystin-NH_3			H_2S			Elem.-S		
mg		% N	mg		% S	mg		% S
ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
6,8	0,57	8,4	13,6	7,1	52,2	256,3	131,8	51,5

Tab. 15

Die vom Schwefel filtrierte Reaktionslösung gab mit p-Hydrazinobenzoesäure einen gelben Niederschlag, der zur Reinigung aus Wasser umkristallisiert wurde[76]). Zersetzungspunkt 231°. Titration: 0,0375; 0,0381 g Substanz: 3,43; 3,43 ccm 0,1 n-NaOH; ber. 3,38; 3,43 ccm 0,1 n-NaOH. Das Hydrazon ist Brenztraubensäure-p-carboxy-phenyl-hydrazon[77]), das synthetisch in schwach essigsaurer Lösung aus 2,64 g Brenztraubensäure und 5,5 g p-Hydrazinobenzoesäure-chlorhydrat dargestellt, ebenfalls den Zersetzungspunkt 231° zeigte.

Spaltung unter Zugabe von p-Hydrazinobenzoesäure.

Substratkonz. = 0,02 m (0,2903 g in 50 ccm); Zersetzungszeit 1 Stunde; t = 99°.

---

[75]) Nur das Cystin-NH_3 wird den Berechnungen zugrundegelegt.

[76]) 0,1 g aus 65 ccm Wasser.

[77]) Es ist keine p-Hydrazinobenzoesäure mehr, da es im Gegensatz dazu ammoniakalisches Silbernitrat erst in der Hitze reduziert.

12 Mole NaOH pro Mol Cystinhydantoin.
Reaktionslösung: 12 ccm n-NaOH + 18 ccm H_2O + 20 ccm einer Lösung von 0,3770 g (= 0,002 Mole) p-Hydrazinobenzoesäure-chlorhydrat.
NH_3: 3,34 ccm 0,1 n-HCl = 5,69 mg. Ber. 34,0 mg. Gef. 16,6% N_2.
H_2S: 20,664 ccm 0,1 n-J = 35,2 mg. Ber. 68,2 mg. Gef. 51,6% S.
Es tritt keine Verschiebung des Reaktionsbildes ein. Der ausgefallene, gelbe Niederschlag enthält außer dem Hydrazon noch den elementaren Schwefel.

5) Spaltung von Dibenzoyl-l-cystin.

Substratkonz. = 0,02 m (0,2242 g in 25 ccm); Zersetzungszeit 2 Stunden; t = 99°.
12 Mole NaOH pro Mol Dibenzoyl-cystin (6 ccm n-NaOH).
NH_3: 2,23; 1,93 ccm 0,1 n-HCl = 3,96; 3,29 mg. — *H_2S:* 4,55; 4,42 ccm 0,1 n-KJO_3 = 7,7; 7,5 mg. — *NH_2-N:* 4 ccm Substratlösung: 0,50 ccm N_2[72]) (22°, 741 mm, 0,14 ccm); für 100 ccm Substratlösung errechnen sich dann 0,157 · 25 = 3,94 ccm N_2 = 3,94 · 1,25 = 4,93 mg N_2. — *N_2:* 5 ccm Substratlösung: 3,78; 3,83 ccm 0,01 n-HCl; 100 ccm Substratlösung: 10,58; 10,72 mg N_2. — *SH (jodometr.):* 20 ccm Substratlösung: 0,14; 0,16 ccm 0,1 n-KJO_3; 100 ccm Substratlösung: 8,48; 9,6 mg Cystein. — *SH und SS (colorimetr.):* Filter S 72; s = 0,5; b = 0,14 und 0,02; 4 ccm Substratlösung:

	E		Ek		Ek_b		Ek_b im Mittel
SH + SS	0,60	0,63	1,20	1,26	1,06	1,12	1,09
SH	0,13	0,14	0,26	0,28	0,24	0,26	0,25

SH: Ek_b 0,25 = 0,43 mg; 100 ccm Substratlösung: 10,75 mg Cystein.
SS: Ek_b 0,59 = 0,91 mg; 100 ccm Substratlösung: 22,75 mg Cystin.
Zusammenstellung der Resultate:

NH_3			NH_2-N			N_2		
mg		% N	mg		% N	mg		% N
ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
17,0	3,5	20,6	14,0	4,9	35,2	14,0	10,7	76,1

H_2S			SH (jodometr.)			SH (colorimetr.)			SS (colorimetr.)		
mg		% S	mg Cystein		% S	mg Cystein		% S	mg Cystin		% S
ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
34,0	7,6	22,4	121,1	9,7	8,0	121,1	10,8	8,9	120,1	22,7	18,9

Tab. 16

6) Spaltung von Diformyl-l-cystin.

Substratkonz. = 0,02 m (0,2963 g in 50 ccm); Zersetzungszeit 2 Stunden; t = 99°.
A. *12 Mole NaOH pro Mol Diformyl-cystin (12 ccm n-NaOH).*
NH_3: 9,4; 9,7; 10,6; 10,7; 10,3 ccm 0,1 n-HCl = 16,0; 16,5; 18,0; 18,2; 17,5 mg. — *H_2S:* 8,30; 8,11; 7,93 ccm 0,1 n-J = 14,1; 13,8; 13,5 mg. — *NH_2-N:* 2 ccm Substratlösung: 0,64; 0,63 ccm N_2[78]) (22°,

[78]) Ohne KJ-Zusatz.

749 mm, 0,12 ccm); für 100 ccm Substratlösung errechnen sich dann 0,228 · 50 = 11,4 ccm N_2 = 11,4 · 1,25 = 14,2 mg N_2. — *Rest-S in* Lösung A: 171,8 mg $BaSO_4$[79]. — *Elem.-S:* 13,5; 13,1 mg. — *SH (jodometr.):* 10 ccm Substratlösung: 0,654; 0,633; 0,678; 0,678; 0,633 ccm 0,1 n-J = 79,1; 76,7; 82,0; 82,0; 76,7 mg Cystein. — *SH und SS (colorimetr.)*[80]: Filter S 57; s = 5; 1; 5; b = 0,03 und 0,02; 1 ccm Substratlösung:

	E			Ek			Ek_b			Ek_b i. Mittel
SH + SS	2,63	0,55	2,50	0,53	0,55	0,50	0,50	0,52	0,47	0,50
SH	1,07	0,22	1,02	0,21	0,22	0,20	0,19	0,20	0,18	0,19

SH: Ek_b 0,19 = 0,641 mg; 100 ccm Substratlösung: 64,1 mg Cystein.
SS: Ek_b 0,12 = 0,40 mg; 100 ccm Substratlösung: 40,0 mg Cystin.

B. *6 Mole NaOH pro Mol Diformyl-cystin (6 ccm n-NaOH).*
NH_3: 8,8; 7,7; 7,8 ccm 0,1 n-HCl = 15,0; 13,1; 13,3 mg. — *H_2S:* 6,67; 6,98; 6,98 ccm 0,1 n-J = 11,4; 11,9; 11,9 mg. — *NH_2-N:* 2 ccm Substratlösung: 0,62 ccm N_2[78] (23°, 755 mm, 0,07 ccm); für 100 ccm Substratlösung errechnen sich dann 0,244 · 50 = 12,2 ccm N_2 = 12,2 · 1,25 = 15,3 mg N_2. — *Rest-S* in Lösung A: 169,0; 157,0 mg $BaSO_4$. — *Elem.-S.:* 14,2; 13,0 mg. — *SH (jodometr.):* 10 ccm Substratlösung: 0,57; 0,57; 0,57 ccm 0,1 n-J = 69,0 mg Cystein. — *SH und SS (colorimetr.):* Filter S 57; s = 1; 5; 5; b = 0,03 und 0,02; 1 ccm Substratlösung:

	E			Ek			Ek_b			Ek_b i. Mittel
SH + SS	0,52	2,36	2,15	0,52	0,47	0,43	0,49	0,46	0,40	0,45
SH	0,18	0,86	0,71	0,18	0,17	0,14	0,16	0,15	0,12	0,14

SH: Ek_b 0,14 = 0,509 mg; 100 ccm Substratlösung: 50,9 mg Cystein.
SS: Ek_b 0,17 = 0,46 mg; 100 ccm Substratlösung: 46,0 mg Cystin.

Zusammenstellung der Resultate:

	NH_3			NH_2-N			Elem.-S		
	mg		% N	mg		% N	mg		% S
	ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
A	34,0	17,2	50,6	28,0	14,2	50,8	64,0	13,3	20,8
B	34,0	13,8	40,7	28,0	15,3	54,3	64,0	13,6	21,3

	H_2S			SH (jodometr.)			SH (colorimetr.)		
	mg		% S	mg Cystein		% S	mg Cystein		% S
	ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
A	68,2	13,8	20,2	242,2	79,5	32,8	242,2	64,1	26,5
B	68,2	11,7	17,2	242,2	69,0	28,5	242,2	50,9	21,1

[79]) vergl. Abschnitt II des experimentellen Teiles (nasse Veraschung).
[80]) Zusammensetzung der Reaktionslösung: 13 ccm Acetatpuffer + 1 ccm Substratlösung + (1 ccm Na_2SO_3) + 4 ccm Folin-Reagens. Ohne Wartezeit *sofort* auf 50 ccm aufgefüllt und nach 15 Minuten colorimetriert.

	SS (colorimetr.) mg Cystin		% S	Rest-S in Lösung A mg $BaSO_4$		% S
	ber.	gef.		ber.	gef.	
A	240,3	40,0	16,7	467,0	171,8	36,8
B	240,3	46,0	19,1	467,0	163,0	34,9

Tab. 17

Spaltung unter Zusatz von p-Hydrazinobenzoesäure.

Substratkonz. = 0,02 m (0,2963 g in 50 ccm); Zersetzungszeit 2 Stunden; t = 99°.
12 Mole NaOH pro Mol Diformyl-cystin.
Reaktionsansatz: 12 ccm n-NaOH + 18 ccm H_2O + 20 ccm einer Lösung von 0,377 g (= 0,002 Mole) p-Hydrazinobenzoesäure-chlorhydrat.
Nach Abfiltration des Hydrazones, das beim Ansäuern der Reaktionslösung ausfiel und Auffüllen der Lösung auf 100 ccm, fand man: *SH (jodometr.):* 10 ccm Substratlösung: 0,88 ccm 0,1 n-J; 100 ccm Substratlösung enthalten dann 0,88 · 1,21 = 43,8% Cystein.
Das Hydrazon wurde in etwa 4 Tropfen Pyridin gelöst, mit 5 ccm Wasser versetzt und titriert. 0,0303 g Substanz: 2,76 ccm 0,1 n-NaOH; ber. 2,73 ccm. Es liegt Brenztraubensäure-p-carboxy-phenylhydrazon vor. Zersetzungspunkt 231°. Auch die Modellsubstanz zeigte 231°, wenn man das Schmelzpunktsröhrchen gegen 225° in den vorgeheizten Berl-Block brachte.

Die nach dem Ansäuern und Verkochen des H_2S erhaltene Substratlösung gab mit Nitroprussidnatrium eine intensive, aber unbeständige rote Farbreaktion. Mit dem Reagens von HOPKINS und COLE ($HgSO_4$ in verdünnter H_2SO_4) wurde ein dichter, weißer Niederschlag erhalten; ebenso mit Bleisalzlösung. Dieses Bleisalz löste sich nicht in der Hitze, während das entsprechende Bleisalz des Diformyl-cystins heiß löslich ist.

Isolierung der SH-Verbindung als Cystein.

Da in den Spaltversuchen etwa 50% N_2 als NH_3 und 50% N_2 als NH_2-N gefunden wurde, mußten durch Hydrolysen neben Ameisensäure Cystin bezw. Cystein entstanden sein. Zur präparativen Isolierung des Cysteins ist unter den oben angegebenen Bedingungen mit größerer Einwage ein weiterer Versuch durchgeführt worden.

Nach der zweistündigen Spaltung wurde im Vakuum bei 50° zur Trockene verdampft, wobei auch der Schwefelwasserstoff weggekocht wird. Den Rückstand löste man in Wasser. Schließlich wurde mit heißer Quecksilberacetatlösung ein Quecksilbersalz des Cysteins gefällt. Die Fällung vervollständigte man mit Hopkins-Reagens. Der Niederschlag dieses Quecksilbermerkaptides wurde in Wasser aufgeschlämmt und nach dem Versetzen mit 20 ccm verd. HCl mit H_2S zersetzt. Vom Quecksilbersulfid filtrierte man ab und vertrieb den H_2S. Die Lösung zeigte intensive Reaktion auf eine SH-Verbindung mit Nitroprussidnatrium und Folin-Reagens. Zur Reinigung stellte man das Cupromerkaptid dar und trug zu diesem Zweck in die Lösung unter mechanischem Rühren langsam frisches Cu_2O ein, bis kein Niederschlag mehr entstand. Das ausgefallene Cupro-

merkaptid wurde abzentrifugiert, zweimal mit Wasser gewaschen und im Exsiccator getrocknet. Anschließend erfolgte wiederum Zersetzung in salzsaurer Lösung mit H_2S. Den H_2S verdrängte man mit CO_2. Von der Lösung, die auf 50 ccm aufgefüllt wurde, verbrauchten 5 ccm 0,90 ccm 0,1 n-J. In der ganzen Lösung waren somit 109 mg Cystein vorhanden. Nun oxydierte man mit einem Überschuß von 5proz. H_2O_2. Aus der mit Natriumacetat abgestumpften Lösung kristallisierte nach einiger Zeit Cystin aus. Man erhielt 36,1 mg. Cystin ist unter dem Mikroskop leicht zu identifizieren.

7) Spaltung von Dibrompropionyl-l-cystin.

Substratkonz. = 0,02 m (0,2551 g in 25 ccm); Zersetzungszeit 2 Stunden; t = 99°.
12 Mole NaOH pro Mol Dibrompropionyl-cystin (6 ccm n-NaOH).
NH_3: 2,116; 2,077 ccm 0,1 n-HCl = 3,60; 3,54 mg. — *H_2S:* 3,585; 3,879 ccm 0,1 n-J = 6,1; 6,6 mg. — *NH_2-N:* 4 ccm Substratlösung: 0,85; 0,84 ccm N_2[78]) (18°, 734 mm, 0,12 ccm); für 100 ccm Substratlösung errechnen sich dann 0,321 · 25 = 8,03 ccm N_2 = 8,03 · 1,25 = 10,0 mg N_2. — *SH (jodometr.):* 20 ccm Substratlösung: 0,515; 0,550 ccm 0,1 n-J; 100 ccm Substratlösung: 31,2; 33,3 mg Cystein. — *SH und SS (colorimetr.):* Filter S 72; s = 0,5; b = 0,12 und 0,06; 4 ccm Substratlösung:

	E		Ek		Ek_b		Ek_b im Mittel
SH + SS	0,51	0,55	1,02	1,10	0,90	0,98	0,94
SH	0,21	0,22	0,42	0,44	0,36	0,38	0,37

SH: Ek_b 0,37 = 0,60 mg; 100 ccm Substratlösung: 15,0 mg Cystein.
SS: Ek_b 0,20 = 0,35 mg; 100 ccm Substratlösung: 8,75 mg Cystin.

Zusammenstellung der Resultate:

NH_3			NH_2-N			H_2S		
mg		% N	mg		% N	mg		% S
ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
17,0	3,6	21,2	14,0	10,0	71,5	34,0	6,4	18,8
SH (jodometr.)			SH (colorimetr.)			SS (colorimetr.)		
mg Cystein		% S	mg Cystein		% S	mg Cystin		% S
ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
121,1	32,2	26,6	121,1	15,0	12,4	120,1	8,8	7,3

Tab. 18

8) Spaltung von Dialanyl-l-cystin.

Substratkonz. = 0,02 m (0,1912 g in 25 ccm); Zersetzungszeit 2 Stunden; t = 99°.
12 Mole NaOH pro Mol Dialanyl-cystin (6 ccm n-NaOH).
NH_3:[81]) 2,556; 2,507 ccm 0,1 n-HCl = 4,35; 4,27 mg. — *H_2S:* 4,698;

[81]) Bei den Cystin*peptid*spaltungen wird stets nur das Cystin-NH_3 den Berechnungen zugrundegelegt.

4,748 ccm 0,1 n-J = 8,01; 8,10 mg. — *NH_2-N:* siehe nächster Versuch. Auswertung des 2-Stunden-Versuches: Für den gesamten Reaktionsansatz errechnen sich 11,9 ccm N_2 = 14,9 mg N_2 = 53,1% des Gesamt-N_2.[82] — *N_2:* 5 ccm Substratlösung: 8,682 ccm 0,01 n-HCl; 100 ccm Substratlösung: 24,3 mg N_2. — *SH (jodometr.):* 20 ccm Substratlösung: 0,790; 0,771 ccm 0,1 n-J; 100 ccm Substratlösung: 47,8; 46,7 mg Cystein. — *Elem.-S:* 1,0; 0,9 mg. — *SH und SS (colorimetr.):* Filter S 72; s = 0,5; b = 0,12 und 0,06; 4 ccm Substratlösung:

	E		Ek		Ek_b		Ek_b im Mittel
SH + SS	0,93	0,91	1,86	1,82	1,74	1,70	1,72
SH	0,31	0,31	0,62	0,62	0,56	0,56	0,56

SH: Ek_b 0,56 = 0,87 mg; 100 ccm Substratlösung: 21,8 mg Cystein.
SS: Ek_b 0,60 = 0,93 mg; 100 ccm Substratlösung: 23,3 mg Cystin.

Zusammenstellung der Resultate:

Cystin-NH_3			NH_2-N			N_2		
mg		% N[83]	mg		% N	mg		% N
ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
17,0	4,3	25,3	28,0	14,9	53,1	28,0	24,3	86,8
Elem.-S			H_2S			SH (jodometr.)		
mg		% S	mg		% S	mg Cystein		% S
ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
32,0	1,0	3,1	34,0	8,1	23,6	121,1	47,2	39,0
SH (colorimetr.)			SS (colorimetr.)					
mg Cystein		% S	mg Cystin		% S			
ber.	gef.		ber.	gef.				
121,1	21,8	18,0	120,1	23,3	19,4			

Tab. 19

Die Abspaltung des Alanylrestes wurde bei diesem Beispiel durch van Slyke-Bestimmungen in getrennten Ansätzen untersucht. Zu diesen Bestimmungen nahm man jeweils 2 ccm der *ursprünglichen* Reaktionslösung. Es ergab sich eine äußerst langsame Hydrolyse der Peptidbindung; auch in den oben durchgeführten Spaltungen werden mithin fast keine neuen NH_2-Gruppen in Freiheit gesetzt.

Zersetzungszeit	0 Min.	10 Min.	1 Std.	2 Std.	8 Std.	18 Std.
Temperatur (t)	22	22	22	22	21	21
Barometer (mm)	751	751	751	751	741	740
Blindwert ccm	0,11	0,11	0,11	0,11	0,13	0,13
ccm N_2 (abgelesen)	2,27	2,26	2,23	2,25	2,36	2,66

Tab. 20

[82]) Dabei ist zu beachten, daß die beiden Alaninreste im Dipeptid allein schon 50% des Gesamt-N_2 ausmachen.

[83]) 25,3% Cystin-N_2 sind 12,7% Gesamt-N_2.

9) Spaltung von Dichloracetyl-l-cystin.

Substratkonz. = 0,02 m (0,1966 g in 25 ccm); Zersetzungszeit 2 Stunden; t = 99°.

A. *12 Mole NaOH pro Mol Dichloracetyl-cystin (6 ccm n-NaOH).* *NH_3:* 2,781; 3,075 ccm 0,1 n-HCl = 4,72; 5,22 mg. — *H_2S:* 5,314; 5,075 ccm 0,1 n-J = 9,03; 8,63 mg. — *NH_2-N:* 4 ccm Substratlösung: 0,795 ccm N_2[781] (18°, 737 mm, 0,13 ccm); für 100 ccm Substratlösung errechnen sich dann 0,286 · 25 = 7,16 ccm N_2 = 7,16 · 1,25 = 8,96 mg N_2. — *N_2:* 5 ccm Substratlösung: 3,79 ccm 0,01 n-HCl; 100 ccm Substratlösung: 10,6 mg. — *SH (jodometr.):* 20 ccm Substratlösung: 0,63; 0,612 ccm 0,1 n-J = 38,0; 37,0 mg Cystein. — *SH und SS (colorimetr.):* Filter S 72; s = 0,5; b = 0,18 und 0,08; 4 ccm Substratlösung:

	E		Ek		Ek_b		Ek_b im Mittel
SH + SS	0,56	0,55	1,12	1,10	0,94	0,92	0,93
SH	0,32	0,30	0,64	0,60	0,56	0,52	0,54

SH: Ek_b 0,54 = 0,842 mg; 100 ccm Substratlösung: 21,0 mg Cystein.
SS: Ek_b 0,0 Cystin.

B. *6 Mole NaOH pro Mol Dichloracetyl-cystin (3 ccm n-NaOH).* *NH_3:* 0,386; 0,444 ccm 0,1 n-HCl = 0,56; 0,75 mg. — *H_2S:* 2,511; 2,463 ccm 0,1 n-J = 4,27; 4,19 mg. — *NH_2-N:* 4 ccm Substratlösung: 0,965 ccm N_2[781] (18°, 734 mm, 0,12 ccm); für 100 ccm Substratlösung errechnen sich dann 0,374 · 25 = 9,36 ccm N_2 = 9,36 · 1,25 = 11,7 mg N_2. — *N_2:* 5 ccm Substratlösung: 5,09 ccm 0,01 n-HCl; 100 ccm Substratlösung: 14,2 mg. — *SH (jodometr.):* 20 ccm Substratlösung: 0,339; 0,444; 0,426 ccm 0,1 n-J = 24,4 mg Cystein. — *SH und SS (colorimetr.):* Filter S 72; s = 1; 1; 0,5; b = 0,18 und 0,08; 4 ccm Substratlösung:

	E			Ek			Ek_b		Ek_b i. Mittel
SH + SS	0,79	0,80	0,41	0,79	0,80	0,82	0,67	0,62	0,64	0,64
SH	0,25	0,21	0,14	0,25	0,21	0,28	0,20	0,16	0,23	0,20

SH: Ek_b 0,20 = 0,357 mg; 100 ccm Substratlösung: 8,9 mg Cystein.
SS: Ek_b 0,24 = 0,40 mg; 100 ccm Substratlösung: 10,0 mg Cystin.

Zusammenstellung der Resultate:

	NH_3			NH_2-N			N_2		
	mg		% N	mg		% N	mg		% N
	ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
A	17,0	5,0	29,4	14,0	9,0	64,1	14,0	10,6	75,8
B	17,0	0,7	4,1	14,0	11,7	83,6	14,0	14,2	100,7

	H_2S			SH (jodometr.)			SS (colorimetr.)			SS (colorimetr.)		
	mg		% S	mg Cystein		% S	mg Cystein		% S	mg Cystin		% S
	ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
A	34,0	8,8	25,9	121,1	37,5	31,0	121,1	21,0	17,4	120,1	0,0	0,0
B	34,0	4,2	12,4	121,1	24,4	20,2	121,1	8,9	7,4	120,1	10,0	8,4

Tab. 21

10) Spaltung von Diglycyl-l-cystin.

Substratkonz. = 0,02 m (0,1772 g[84]) in 25 ccm); Zersetzungszeit 2 Stunden; t = 99°.

12 Mole NaOH pro Mol Diglycyl-cystin (6 ccm n-NaOH).

NH_3: 3,00; 3,05 ccm 0,1 n-HCl = 5,11; 5,19 mg. — *H_2S:* 5,76; 5,78 ccm 0,1 n-J = 9,79; 9,83 mg. — *NH_2-N:* 4 ccm Substratlösung: 1,46 ccm N_2[72]) (22°, 741 mm, 0,16 ccm); für 100 ccm Substratlösung errechnen sich dann 0,569 · 25 = 14,2 ccm N_2 = 14,2 · 1,25 = 17,8 mg N_2. — *N_2:* 5 ccm Substratlösung: 8,39 ccm 0,01 n-HCl; 100 ccm Substratlösung: 23,5 mg. — *SH (jodometr.):* 20 ccm Substratlösung: 0,58; 0,59 ccm 0,1 n-J; 100 ccm Substratlösung: 35,2; 35,6 mg Cystein. — *SH und SS (colorimetr.):* Filter S 72; s = 0,5; b = 0,16 und 0,02; 4 ccm Substratlösung:

	E		Ek		Ek_b		Ek_b im Mittel
SH + SS	1,09	1,06	2,18	2,12	2,02	1,96	1,99
SH	0,40	0,40	0,80	0,80	0,78	0,78	0,78

SH: Ek_b 0,78 = 1,186 mg; 100 ccm Substratlösung: 29,6 mg Cystein.
SS: Ek_b 0,43 = 0,68 mg; 100 ccm Substratlösung: 17,0 mg Cystin.

Zusammenstellung der Resultate:

Cystin-NH_3			NH_2-N			N_2		
mg		% N	mg		% N	mg		% N
ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
17,0	5,2	30,6	28,0	17,8	63,7	28,0	23,5	83,9

H_2S			SH (jodometr.)			SH (colorimetr.)			SS (colorimetr.)		
mg		% S	mg Cystein		% S	mg Cystein		% S	mg Cystin		% S
ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
34,0	9,8	28,8	121,1	35,4	29,2	121,1	29,6	24,5	120,1	17,0	14,2

Tab. 22

11) Spaltung von Dicarbobenzoxy-l-cystin.

Substratkonz. = 0,02 m (0,2542 g in 25 ccm); Zersetzungszeit 2 Stunden; t = 99°

12 Mole NaOH pro Mol (Dicarbobenzoxy-cystin (6 ccm n-NaOH).

NH_3: 1,51; 1,62 ccm 0,1 n-HCl = 2,57; 2,75 mg. — *H_2S:* 2,74; 2,56 ccm 0,1 n-KJO_3 = 4,66; 4,35 mg. — *NH_2-N:* 4 ccm Substratlösung: 0,64 ccm N_2[72]) (22°, 741 mm, 0,14 ccm); für 100 ccm Substratlösung errechnen sich dann 0,218 · 25 = 5,48 ccm N_2 = 5,48 · 1,25 = 6,8 mg N_2. — *N_2:* 5 ccm Substratlösung: 4,34; 4,13 ccm 0,01 n-HCl; 100 ccm Substratlösung: 12,15; 11,56 mg. — *SH (jodometr.):* 20 ccm Substratlösung: 0,46; 0,50 ccm 0,1 n-KJO_3; 100 ccm Substratlösung: 27,8; 30,2

[84]) Wie schon mitgeteilt, ist das Präparat 96proz. Statt 0,1772 g waren daher 0,1845 g einzuwiegen.

mg Cystein. — *SH und SS (colorimetr.):* Filter S 72; s = 0,5; b = 0,14 und 0,02; 4 ccm Substratlösung:

	E		Ek		Ek_b		Ek_b im Mittel
SH + SS	0,93	0,96	1,86	1,92	1,72	1,78	1,75
SH	0,41	0,43	0,82	0,86	0,80	0,84	0,82

SH: Ek_b 0,82 = 1,24 mg; 100 ccm Substratlösung: 31,0 mg Cystein.
SS: Ek_b 0,11 = 0,21 mg; 100 ccm Substratlösung: 5,2 mg Cystin.

Zusammenstellung der Resultate:

NH_3			NH_2-N			N_2		
mg		% N	mg		% N	mg		% N
ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
17,0	2,7	15,9	14,0	6,8	48,8	14,0	11,9	85,0

H_2S			SH (jodometr.)			SH (colorimetr.)			SS (colorimetr.)		
mg		% S	mg Cystein		% S	mg Cystein		% S	mg Cystin		% S
ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
34,0	4,5	13,3	121,1	29,0	23,9	121,1	31,0	25,6	120,1	5,2	4,3

Tab. 23

12) Spaltung von Dicarbobenzoxy-l-cystinyl-diglycin.

Substratkonz. = 0,02 m (0,3112 g in 25 ccm); Zersetzungszeit 2 Stunden; t = 99°.
12 Mole NaOH pro Mol Dicarbobenzoxy-cystinyl-diglycin (6 ccm n-NaOH). *NH_3:* 0,38; 0,39 ccm 0,1 n-HCl = 0,65; 0,66 mg. — *H_2S:* 9,97; 10,37 ccm 0,1 n-KJO_3 = 16,95; 17,63 mg. — *NH_2-N:* 4 ccm Substratlösung: 0,50 ccm N_2 [72] (17°, 748 mm, 0,16 ccm); für 100 ccm Substratlösung errechnen sich dann 0,154 · 25 = 3,85 ccm N_2 = 3,85 · 1,25 = 4,8 mg N_2. — *N_2:* 5 ccm Substratlösung: 9,51 ccm 0,01 n-HCl; 100 ccm Substratlösung: 26,6 mg. — *Elem.-S:* 8,1 mg. — *SH (jodometr.):* 0,0 mg Cystein. — *SS (colorimetr.):* Filter S 72; s = 1; b = 0,14; 4 ccm Substratlösung: Ek 0,61; 0,61; Ek_b 0,47 = 0,74 mg; 100 ccm Substratlösung: 18,5 mg Cystin.

Zusammenstellung der Resultate:

Cystin-NH_3			NH_2-N			N_2		
mg		% N	mg		% N	mg		% N
ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
17,0	0,7	4,1	28,0	4,8	17,2	28,0	26,6	95,0

Elem.-S			H_2S			SH (jodometr.)			SS (colorimetr.)		
mg		% S	mg		% S	mg Cystein		% S	mg Cystin		% S
ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
32,1	8,1	25,2	34,0	17,3	50,8	121,1	0	0	120,1	18,5	15,4

Tab. 24

13) Spaltung von l-Cystinyl-diglycin.

Substratkonz. = 0,02 m (0,1772 g[85]) in 25 ccm); Zersetzungszeit 2 Stunden; t = 99°.

12 Mole NaOH pro Mol Cystinyl-diglycin (6 ccm n-NaOH).

NH_3: 4,05; 4,28 ccm 0,1 n-HCl = 6,9; 7,3 mg. — *H_2S:* 6,76; 6,25 ccm 0,1 n-KJO_3 = 11,5; 10,6 mg. — *NH_2-N:* 4 ccm Substratlösung: 1,45 ccm N_2[72]) (20°, 756 mm, 0,13 ccm); für 100 ccm Substratlösung errechnen sich dann 0,593 · 25 = 14,8 ccm N_2 = 14,8 · 1,25 = 18,5 mg N_2. — *N_2:* 5 ccm Substratlösung: 7,80; 7,77 ccm 0,01 n-HCl; 100 ccm Substratlösung: 21,8; 21,7 mg. — *SH (jodometr.):* 20 ccm Substratlösung: 0,64; 0,72 ccm 0,1 n-KJO_3; 100 ccm Substratlösung: 38,8; 43,6 mg Cystein. — *SH und SS (colorimetr.):* Filter S 72; s = 0,5; b = 0,16 und 0,02; 4 ccm Substratlösung:

	E		Ek		Ek_b		Ek_b im Mittel
SH + SS	1,45	1,47	2,90	2,94	2,74	2,78	2,76
SH	0,60	0,63	1,20	1,26	1,18	1,24	1,21

SH: Ek_b 1,21 = 1,785 mg; 100 ccm Substratlösung: 44,6 mg Cystein.
SS: Ek_b 0,34 = 0,55 mg; 100 ccm Substratlösung: 13,7 mg Cystin.

Zusammenstellung der Resultate:

Cystin-NH_3			NH_2-N			N_2		
mg		% N	mg		% N	mg		% N
ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
17,0	7,1	41,8	28,0	18,5	66,2	28,0	21,8	77,8

H_2S			SH (jodometr.)			SH (colorimetr.)			SS (colorimetr.)		
mg		% S	mg Cystein		% S	mg Cystein		% S	mg Cystin		% S
ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
34,0	11,1	32,6	121,1	41,2	34,0	121,1	44,6	36,9	120,1	13,7	11,5

Tab. 25

14) Spaltung von SS-Glutathion.

Substratkonz. = 0,02 m (0,3062 g in 25 ccm); Zersetzungszeit 2 Stunden; t = 99°.

12 Mole NaOH pro Mol GSSG (8 ccm n-NaOH).[86])

NH_3: 5,33; 6,21 ccm 0,1 n-HCl = 9,08; 10,58 mg. — *H_2S:* 14,03; 13,34 ccm 0,1 n-KJO_3 = 23,85; 22,67 mg. — *NH_2-N:* 2 ccm Substratlösung: 1,05 ccm N_2[72]) (22°, 741 mm, 0,15 ccm); für 100 ccm Substratlösung errechnen sich dann 0,395 · 50 = 19,7 ccm N_2 = 19,7 · 1,25 = 24,7 mg N_2. — *N_2:* 5 ccm Substratlösung: 12,91; 11,57 ccm 0,01 n-HCl; 100 ccm Substratlösung: 36,1; 32,4 mg. — *Elem.-S:* 3,8; 5,5 mg. — *SH (jodometr.):* 0,0 mg Cystein. — *SS (colorimetr.):* Filter S 72; s = 1;

[85]) Das Präparat ist 70,5proz. Statt 0,1772 g müssen 0,2513 g eingewogen werden.

[86]) 2 ccm n-NaOH für die vier HOOC-Gruppen des Glutathions.

b = 0,13; 4 ccm Substratlösung: E 0,32; 0,28; Ek_b 0,19; 0,15 = 0,30 mg; 100 ccm Substratlösung: 7,5 mg Cystin.

Zusammenstellung der Resultate:

Cystin-NH_3			NH_2-N			N_2		
mg		% N	mg		% N	mg		% N
ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
17,0	9,8	57,6	42,0	24,7	58,8	42,0	34,3	81,8

Elem.-S			H_2S			SH (jodometr.)			SS (colorimetr.)		
mg		% S	mg		% S	mg Cystein		% S	mg Cystin		% S
ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
32,1	4,7	14,6	34,0	23,3	68,8	121,1	0	0	120,1	7,5	6,3

Tab. 26

15) Einwirkung von NaOH auf SH-Glutathion.

Substratkonz. = 0,02 m (0,1536 g in 25 ccm); Zersetzungszeit 2 Stunden; t = 99°.

12 Mole NaOH pro Mol GSH (7 ccm n-NaOH).[87])

NH_3: 0,90; 0,88 ccm 0,1 n-HCl = 1,53; 1,50 mg. — *H_2S:* 4,33; 4,27 ccm 0,1 n-KJO_3 = 7,36; 7,26 mg. — *NH_2-N:* 4 ccm Substratlösung: 1,26 ccm N_2[72]) (22°, 741 mm, 0,15 ccm); für 100 ccm Substratlösung errechnen sich dann 0,485 · 25 = 12,2 ccm N_2 = 12,2 · 1,25 = 15,2 mg N_2. — *N_2:* 5 ccm Substratlösung: 7,04; 7,29 ccm 0,01 n-HCl; 100 ccm Substratlösung: 19,71; 20,4 mg. — *SH (jodometr.):* 20 ccm Substratlösung: 0,61; 0,60 ccm 0,1 n-KJO_3; 100 ccm Substratlösung: 37,0; 36,3 mg Cystein. — *SH (colorimetr.):* Filter S 72; s = 0,5; b = 0,13 und 0,02; 4 ccm Substratlösung:

	E		Ek		Ek_b	
SH mit Sulfit	/	1,06	/	2,12	/	1,99
SH ohne Sulfit	0,54	0,51	1,08	1,01	1,06	0,99

SH: Ek_b 1,03 = 1,548 mg; 100 ccm Substratlösung: 38,7 mg Cystein.

Zusammenstellung der Resultate:

Cystein-NH_3			NH_2-N			N_2		
mg		% N	mg		% N	mg		% N
ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
8,5	1,5	17,6	21,0	15,2	72,3	21,0	20,1	95,5

H_2S			SH (jodometr.)			SH (colorimetr.)		
mg		% S	mg Cystein		% S	mg Cystein		% S
ber.	gef.		ber.	gef.		ber.	gef.	
17,0	7,3	43,0	60,5	36,6	60,1	60,5	38,7	64,0

Tab. 27

[87]) 1 ccm n-NaOH für die zwei HOOC-Gruppen des Glutathions.

LEBENSLAUF.

Ich, *Theo Hornung,* wurde am 7. August 1912 als Sohn des Fabrikanten *Josef Hornung* und seiner Ehefrau *Maria,* geb. Zemmerich. geboren.

Nach vierjährigem Besuch der Volksschule in Würzburg besuchte ich daselbst zunächst das Neue Gymnasium. Nach drei Jahren trat ich 1925 in das Realgymnasium über, das ich nach Ablegung der Reifeprüfung 1931 verließ. Seit dem Sommersemester 1931 studierte ich an der Universität Würzburg Chemie. Am 6. März 1934 legte ich hier das 1. chemische Verbandsexamen ab. Das Sommersemester 1934 verbrachte ich an der Universität Königsberg. Wiederum in Würzburg, unterzog ich mich am 25. Juni 1935 dem 2. chemischen Verbandsexamen. Seit dieser Zeit bin ich im chemischen Praktikum für Mediziner als Assistent tätig.

Vom September 1935 bis Dezember 1937 war ich mit vorliegender Arbeit beschäftigt.